

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL
ECUADOR**

FACULTAD DE MEDICINA



**PREVALENCIA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA
METICILINA, AISLADOS EN TRABAJADORES DE GRANJAS
PORCINAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA 2014.**

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE MÉDICO
CIRUJANO GENERAL

AUTOR:

SEBASTIÁN ANDREE RIVADENEIRA ROJAS

DIRECTORA:

Dra. Jeannete Zurita S.

TUTORA METODOLÓGICA:

Ana María Troya Z. Msc.

Quito, 2014

DEDICATORIA

A mi Madre, *Ing. Kathya Rojas Proaño*, quien con tanto esfuerzo, tomó decisiones duras y difíciles, para cumplir con su deber. Por ello, estaré eternamente agradecido con ella y con Dios por haberme bendecido con un ser tan benévolo y trabajador.

A mi Segunda Madre, *Lic. Elena Proaño Morales*, quien entregó devotamente su vida a la crianza de su primer nieto, y que su labor continúa constantemente como Abuela. Una estrella que ha marcado la vida de sus tres únicos nietos, enriqueciéndolos cada día con su existencia.

A mi Tercera Madre, que sin lazo consanguíneo, mantuvo una relación maternal que sobrepasa los límites de la vida, mi Tía *Lic. Elvia Bolaños Obando†*, que físicamente me apoyó hasta los 22 años de edad, pero sus enseñanzas estarán presentes por el resto mi vida.

A mis adorados Hermanos *Nicole y Víctor Hugo Rivadeneira Rojas*. Quienes han sido testigos de la decidida lucha de nuestra Madre, y también han sabido apoyarme a toda hora, otorgándome la confianza y dicha de tenerlos en mi vida. Convirtiéndose en mi único orgullo.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, abuelita y hermanos quienes han sido el motor para construir mis sueños.

A mis primos/as y tías/os que han estado siempre en los buenos y malos momentos.
En especial a la Ing. Alejandra Proaño por ser un ejemplo de perseverancia.

A mis amigos que desinteresadamente me han apoyado en toda circunstancia.

A todo el personal de la Unidad de Investigación en Biomedicina de Zurita & Zurita Laboratorios, quienes hicieron posible gran parte de este magnífico proyecto.

A la Dra. Jeannete Zurita, quien me ha demostrado que el Médico debe empaparse de todo tipo de ciencias y artes.

A Ana María Troya Msc. que me ha brindado una visión más justa y ética de la investigación médica.

A todos mis profesores que a lo largo de la carrera, me han sabido forjar en conocimiento y carácter. Siempre estaré orgulloso de haberme formado en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Y a Dios que ha sido la guía para poder seguir siempre adelante.

Item ad lucem

TABLA DE CONTENIDO

1.	CAPÍTULO: INTRODUCCIÓN.....	3
2.	CAPÍTULO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1.	Taxonomía del género <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2.	<i>Staphylococcus</i>	6
2.3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.3.1.	Etimología.....	7
2.3.2.	Pruebas bioquímicas para la identificación del género <i>Staphylococcus</i>	8
2.3.2.1.	Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>S. aureus</i>	8
2.3.3.	Pruebas para la identificación genética de <i>S. aureus</i>	9
2.3.3.1.	La identificación del gen <i>nuc</i>	9
2.4.	Factores de virulencia	10
2.5.	Colonización	13
2.5.1.	Defensa nasal	14
2.5.2.	Patogenia.....	14
2.6.	Resistencia a la meticilina.....	16
2.6.1.	Historia.....	16
2.6.2.	Resistencia hospitalaria y comunitaria.....	19
2.6.3.	Mecanismos de resistencia a los antibióticos en el <i>S. aureus</i>	21
2.6.5.	Mecanismos de transferencia genética.....	25
2.7.	Genética de la resistencia en <i>S. aureus</i>	27
2.7.1.	Gen <i>mecA</i>	27
2.7.2.	Patrones de resistencia a la vancomicina	28
2.7.3.	Papel de la Leucocidina Panton-Valentine (PVL)	29
2.8.	Métodos de diagnóstico específicos de MRSA	30

2.8.1.	Identificación fenotípica en medios de cultivo	30
2.8.2.	Vitek2 Compact®	30
2.8.3.	PCR.....	31
2.9.	Resistencia a los antibióticos en el Ecuador	31
2.9.1.	Abuso y mal uso de antibióticos	31
2.9.2.	Transferencia de resistencia antimicrobiana de animales a humanos. 33	
2.10.	MRSA y su relación con el ganado porcino	34
2.11.	Transferencia de MRSA a polcicultures	35
2.12.	Justificación	39
2.13.	Problema	41
2.14.	Objetivo principal	41
2.15.	Objetivos específicos	41
2.16.	Hipótesis	42
3.	CAPÍTULO: METODOLOGÍA.....	43
3.1.	Tipo de Estudio	43
3.2.	Población.....	43
3.1.1.	Identificación de la población.....	43
3.3.	Trabajo de campo.....	44
3.4.	Variables.	48
3.2.	Criterios de inclusión y exclusión.....	49
3.3.	Cálculo de la muestra.....	49
3.4.	Procedimientos de recolección de información:	51
3.5.	Análisis de datos	51
3.5.1.	Recolección de datos - Fase pre analítica	51

3.5.2.	Fase Analítica – Laboratorio.....	52
3.5.3.	Recopilación de Resultados – Fase post analítica.....	53
3.6.	Aspectos bioéticos	54
3.7.	Aspectos administrativos	55
4.	CAPÍTULO: RESULTADOS	56
4.1.	Frecuencia bacteriana.....	56
4.2.	Distribución de bacterias identificadas según su ubicación geográfica	56
4.3.	Frecuencias de meticilino resistencia y sensibilidad en las cepas aisladas de <i>S. aureus</i> , según distribución geográfica	57
4.4.	Crecimiento fenotípico de meticilino resistencia en las cepas de <i>S. aureus</i> ..	57
4.5.	Prevalencia de MRSA en cuidadores de ganado porcino, Pichincha.	58
4.6.	Perfiles de resistencia de los <i>S. aureus</i> aislados a nivel nasal.	58
4.7.	Distribución del perfil de resistencia y sensibilidad a la meticilina de <i>S. aureus</i> aislados, acorde al grupo etario y sexo.	61
4.8.	Distribución de la presencia de genes <i>nuc</i> , <i>mecA</i> y <i>Luk s/F</i> codifican <i>PVL</i> , en <i>S. aureus</i> aislados	62
4.9.	Factores de exposición en los cuidadores de ganado porcino.....	64
4.9.1.	Carga promedio de horas al día que emplean a la porcicultura.	64
4.9.2.	Años dedicados a la porcicultura	65
4.10.	Índices estadísticos de valoración necesarios para la evaluación de una prueba diagnóstica.	66
4.11.	Métodos de identificación fenotípicos	69
4.11.1.	Coagulasa frente al Vitek2®.....	69
4.11.2.	CHROMagar MRSA® frente alVitek2®	70
4.12.	Evaluación de los métodos diagnósticos genotípicos	71
4.12.1.	Gen <i>mecA</i> vs. Vitek2®.....	71

4.12.2.	Gen <i>nuc</i> vs. Vitek2®	72
5.	CAPÍTULO: DISCUSIÓN	74
5.1.	Colonización bacteriana nasal.....	74
5.2.	<i>S. aureus</i> meticilino resistente (MRSA) en cuidadores de ganado porcino..	75
5.2.1.	Datos demográficos	78
5.3.	Factores de exposición medidos con riesgo relativo.....	78
5.4.	Utilidad del CHROMagar MRSA®.....	81
5.5.	La prueba de coagulasa en <i>S. aureus</i>	82
5.6.	Perfiles de resistencia de los <i>S. aureus</i> aislados	83
5.7.	Presencia de genes <i>nuc</i> , <i>mecA</i> y <i>luk s/f</i> codificantes de <i>PVL</i> en los <i>S. aureus</i> aislados.....	84
6.	CAPÍTULO: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	87
6.1.	Conclusiones.....	87
6.2.	Fortalezas del estudio.....	90
6.3.	Debilidades del estudio.....	92
6.4.	Recomendaciones	94

ABREVIATURAS

AGROCALIDAD	Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad Agropecuaria.
ASPE	Asociación Porcicultores del Ecuador
CA-MRSA	MRSA asociado a la comunidad
HA-MRSA	MRSA asociado al ambiente Hospitalario
LA-MRSA	Siglas en inglés: Livestock (ganadería) associated MRSA
<i>MecA</i>	Gen que otorga la meticilino resisitencia al <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Siglas en inglés: Meticiline resistance <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Nuc</i>	Gen específico para la especie <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	Siglas en inglés: Polymerase Chain reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PVL	Toxina, Leucocidina Pantón-Valentine
SARM	Siglas en español: <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
Vitek2®	Sistema de identificación microbiana automatizada que utiliza espectometría. Además reporta perfiles de resistencia de los aislamientos.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	Colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar sangre.....	94
Figura 2	Factores de virulencia del <i>S. aureus</i>	94
Figura 3	Sitios de infección comunes del <i>Staphylococcus aureus</i>	95
Figura 4	Anatomía interna nasal anterior.....	96
Figura 5	Tendencia in crescendo de las tasas de incidencia de MRSA en los últimos 30 años.....	96
Figura 6	Mecanismo de resistencia bacteriana.....	97
Figura 7	Mecanismo de acción para activar el gen <i>mecA</i> y la formación de PBP-2A.	98
Figura 8	Mecanismo de acción de los genes codificantes <i>luk s/f</i> para PVL....	99
Figura 9	La resistencia a la vancomicina en <i>enterococos</i>	100
Figura 10	Hisopado nasal anterior, protocolizado por la CDC.....	101
Figura 11	Ubicación de granjas de ganado porcino en el Ecuador. Datos del censo nacional. (AGROCALIDAD 2012).....	102
Figura 12	Población de ganado porcino por provincia y número de granjas. Datos del censo nacional. (AGROCALIDAD 2012))......	103
Figura 13	Frecuencias de diferentes tipos de <i>Staphylococcus</i> identificados por Vitek2®.....	104
Figura 14	Frecuencias de crecimiento bacteriano en CHROMagar MRSA® como prueba fenotípica, para diferenciar sensibilidad y resistencia a la meticilina en <i>S.aureus</i> aislados, provenientes de los hisopados	

	nasales de cuidadores de ganado porcino, en la provincia de Pichincha, 2014.....	105
Figura 15	Prevalencia de <i>S.aureus</i> resistente a meticilina, identificados por Vitek2®. En cuidadores en contacto continuo de ganado porcino, sin factores de riesgo nosocomial, Pichincha, 2014.....	106
Figura 16	Perfiles de resistencia obtenidos del sistema Vitek2® de <i>S. aureus</i> aislados.	107
Figura 17	Distribución de <i>S. aureus</i> meticilino sensibles y resistentes, divididos por grupo etario y sexo.	108
Figura 18	Distribución genética de la presencia de <i>nuc</i> , <i>mecA</i> y <i>luk s/f</i> , en los <i>S. aureus</i> aislados.....	109
Figura 19	Distribución de portadores de <i>S. aureus</i> , en relación a la carga horaria promedio diaria, dedicada por los cuidadores al contacto continuo de ganado porcino, agrupados por sexo y perfil de resistencia a la meticilina. Provincia de Pichincha, 2014.	110
Figura 20	Distribución de portadores de <i>S. aureus</i> , por los años laborales dedicados a la producción de ganado, agrupados por sexo y perfil de resistencia a la meticilina. Provincia de Pichincha, 2014.....	111
Figura 21	Comparación de resultados fenotípicos, entre prueba de coagulasa en 24 horas <i>versus</i> identificación por Vitek2®, para la especie <i>S. aureus</i> , en la muestras obtenidas en cuidadores al contacto continuo de ganado porcino, sin criterios nosocomiales. Provincia de Pichincha, 2014.....	112
Figura 22	Comparación de resultados fenotípicos, entre el crecimiento en agar	

	sólido colorimétrico (CHROMagar MRSA®) <i>versus</i> identificación por Vitek2®, en la muestras obtenidas en cuidadores al contacto continuo de ganado porcino, sin criterios nosocomiales. Provincia de Pichincha, 2014.	113
Figura 23	Comparación de resultados genotípicos, entre presencia del gen <i>mecA</i> identificado por PCR multiplex <i>versus</i> el perfil de resistencia a la meticilina reportado por Vitek2®, de la muestra obtenida en cuidadores al contacto continuo de ganado porcino, sin criterios nosocomiales. Provincia de Pichincha, 2014.....	114
Figura 24	Comparación de resultados genotípicos, entre presencia del gen <i>nuc</i> identificado por PCR multiplex <i>versus</i> Vitek2®, en los <i>S. aureus</i> aislados, de la muestra obtenida en cuidadores al contacto continuo de ganado porcino, sin criterios nosocomiales. Provincia de Pichincha, 2014.	115
Figura 25	Modelo de transmisión de MRSA en las granjas porcícolas.....	116

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Taxonomía de las distintas especies del género <i>Staphylococcus</i>	117
Tabla 2	Ubicación por parroquias productoras de ganado porcino en la provincia de Pichincha, agrupadas por el recuento de crecimiento bacteriano, de las diferentes especies <i>Staphylococcus</i> aisladas.....	117
Tabla 3	Frecuencias de aislamientos identificados por Vitek2®, agrupados por su sensibilidad y resistencia a la meticilina en los sitios de producción de ganado porcino. Provincia de Pichincha, 2014.....	117
Tabla 4	Recuento diferenciado, por carga horaria (exposición) en los aislamientos de <i>S. aureus</i> meticilino sensible y resistente.....	118
Tabla 5	Recuento diferenciado, por años laborales dedicados a la porcicultura (exposición) en los aislamientos de <i>S. aureus</i> meticilino sensible y resistente.	118
Tabla 6	Recuento diferenciado, por resultados de coagulasa vs. Vitek2®, en aislamientos de <i>S. aureus</i> , para la evaluación como prueba fenotípica.....	118
Tabla 7	Recuento diferenciado, por crecimiento en CHROMagar MRSA® vs. Vitek2®, en aislamientos de <i>S. aureus</i> , para la evaluación como prueba fenotípica de meticilino resistencia.....	119
Tabla 8	Recuento diferenciado, por presencia de gen <i>mecA</i> identificado por PCR multiplex vs. perfiles de resistencia emitidos por Vitek2®, para la evaluación como prueba genotípica de meticilino resistencia..	120
Tabla 9	Recuento diferenciado, por gen <i>nuc</i> identificado por PCR	

vs. tipificación por Vitek2®, para la evaluación como prueba genotípica de especie <i>aureus</i>	121
--	-----

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1	Glosario.....	122
Anexo 2	Fotografías del trabajo de campo.....	123
Anexo 3	Consentimiento Informado.....	124
Anexo 4	Carta de aprobación por el Comité de Bioética de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.....	125
Anexo 5	Mapas.....	126

RESUMEN

PREVALENCIA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA, AISLADOS EN TRABAJADORES DE GRANJAS PORCINAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA 2014.

AUTOR: Rivadeneira Rojas Sebastián Andree.

ANTECEDENTES: *Staphylococcus aureus* metilino resisistente puede producir infecciones en tejidos blandos, neumonía, sepsis entre otras. Se pueden transmitir tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario por el contacto con una persona infectada, un objeto contaminado, y en la comunidad se añade que puede ser el resultado del hacinamiento, falta de limpieza y/o zoonosis.

OBJETIVO: Determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* metilinoresistente (MRSA) en trabajadores vinculados al cuidado de ganado porcino, mediante métodos fenotípicos y genotípicos.

MÉTODOS: El aislamiento de *S. aureus* se realizó por inoculación de hisopados nasales, simultáneamente en CHROMagar MRSA® y agar manitol salado (MSA). Los aislamientos de MRSA fenotípicamente sospechosos en CHROMagar MRSA®, han sido sometidos para confirmación genotípica utilizando un ensayo de PCR múltiple para *nuc* (un gen *S. aureus*-específica de la especie, que codifica term nucleasa enzima), *mecA* (resistencia a la metilina gen) y *luk s/f* (genes que codifican la toxina PVL). Además, se utilizó la detección simultánea por el sistema Vitek2® para determinar la resistencia a los agentes antimicrobianos.

RESULTADOS: La frecuencia de aislamiento de *S. aureus* fue de un 30,4% (35 de 115) en los cuidadores de ganado porcino. Los aislamientos de *S. aureus* de los humanos tenían una mayor resistencia a los siguientes antimicrobianos: penicilina G (91,4%), eritromicina (37,1%), clindamicina (31,4%) y tetraciclina (25,7%). En menor porcentaje hubo resistencia a gentamicina (11,4%) y trimetoprima-sulfametoxazol (5,7%) y quinolonas (8,6%). No hubo resistencia (0%) a la rifampicina, vancomicina ni linezolid. El sistema Vitek2® informó la frecuencia de resistencia a la oxacilina (metecilina) del 20% (7/35) en *S. aureus* aislados en los porcicultores. Esta proporción representa la prevalencia de MRSA, del 6,08% (7/115) en la muestra calculada en los cuidadores de ganado porcino.

CONCLUSIONES: El aislamiento de *S. aureus* a nivel nasal es de un 30,4% (35/115) y la prevalencia de MRSA en los cuidadores de ganado porcino en la provincia de Pichincha es de un 6,08% (7/115). Estas proporciones son similares a las identificadas alrededor del mundo. La investigación de los potenciales factores de transmisión de MRSA y su resistencia a múltiples antimicrobianos en la comunidad, debe hacerse tanto en animales como en las personas que los cuidan, con el fin de evaluar el impacto en la salud humana.

PALABRAS CLAVE: *S. aureus*; MRSA; prevalencia; Ecuador; cuidador de cerdos.

1. CAPÍTULO: INTRODUCCIÓN

« El científico que no sabe lo que está buscando,
no comprenderá lo que encuentra.

La Ciencia aumenta nuestro poder en la proporción,
en que disminuye nuestro orgullo.».

Claude Bernard, Médico Fisiólogo Francés.

A inicios del siglo pasado, al poco tiempo del descubrimiento de los antibióticos se reportó, en investigaciones alrededor del mundo, el surgimiento de resistencia progresiva a antibióticos. En la actualidad, se confirma que su uso masivo y en muchos casos el mal uso en infecciones humanas (prescripción de antibióticos para tratamiento de infecciones virales), junto con el abuso desproporcionado en la industria animal como promotores de crecimiento han colaborado enormemente en que esta resistencia bacteriana se convierta en un problema de salud pública y una amenaza permanente a nivel local y global.

En Ecuador, como en Latinoamérica, la venta libre de antibióticos ha provocado una utilización desmedida tanto para tratamiento de humanos y animales. Esto representa uno de los mayores retos al momento de frenar la generación de cepas bacterianas resistentes. Entre los microorganismo punteros en adquisición de resistencia se

encuentra *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria es uno de los patógenos más trascendentes de la historia, marcando en el ser humano una amplia gama infecciones en la gran mayoría de tejidos como neumonías, abscesos, osteomielitis, celulitis, fascitis necrotizante, sepsis entre otras. Actualmente, se asegura que es protagonista de gran parte de la morbilidad tanto a nivel hospitalario como comunitario.

La introducción de la penicilina redujo la tasa de mortalidad de las infecciones sistémicas por *S. aureus* en la década de los 40's, pero al poco tiempo se lograron identificar cepas resistentes que habían desarrollado mutaciones para sobrevivir bajo la nueva presión evolutiva. Cuando se detectó el apareamiento de resistencia a la penicilina, se creó la oxacilina (metililina), un derivado semisintético invulnerable a las penicilinasas, el mismo que a corto plazo fue superado nuevamente, por la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes. En 1953, se aísla la vancomicina un antibiótico que puede ser usado en caso de cepas resistentes a la metililina. A finales del siglo XX, se reporta la primera cepa en el Japón, con patrón de resistencia a la vancomicina en esta bacteria. Con esta pequeña revisión histórica se demuestra la capacidad agresiva de *S. aureus* para adquirir resistencia a los antibióticos.

S. aureus se presenta frecuentemente en el cuerpo humano de forma asintomática, colonizando mucosas y piel. Sin embargo, este microorganismo puede causar un amplio espectro de patologías que van desde infecciones en tejidos blandos hasta el compromiso sistémico letal. Es por eso que en la actualidad se considera que la colonización, es un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones clínicas. Los

primeros reportes de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés), se realizaron en hospitales, considerándolo como un agente patógeno nosocomial (HA-MRSA). No obstante a inicios de este siglo, se reportó en poblaciones aparentemente sanas, sin exposición previa al ambiente hospitalario, los primeros brotes de MRSA adquirido en la comunidad (CA-MRSA). Por esta razón se empezó a investigar, y se identificó que individuos en relación estrecha con la ganadería podrían presentar un riesgo de colonización por cepas MRSA. En Europa, se ha descrito varios casos de contagio de MRSA asociado a la comunidad en trabajadores en granjas porcinas. El primer caso fue descrito en Holanda alrededor del 2005, donde se evidenció que cepas de MRSA eran comunes entre los trabajadores y el ganado porcino. En base a esta evidencia, se empezó a investigar los mecanismos de transferencia y el comportamiento del MRSA entre el ganado y los humanos. Finalmente, demostrando que cepas MRSA pueden colonizar ambas poblaciones a nivel nasal.

En Ecuador, no existen estudios que indiquen la proporción de portadores de MRSA a nivel nasal. Se debe tomar en cuenta que este microorganismo es capaz de establecerse en el ser humano y potencialmente ser causa importante de infecciones; ya que, el manejo de este tipo de cepas representa un gran desafío clínico. Es por eso que el objetivo del presente estudio es determinar la prevalencia de portadores nasales de MRSA en los cuidadores de ganado porcino, en Pichincha.

2. CAPÍTULO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

«La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante».

Miguel de Unamuno, Escritor Español.

2.1. Taxonomía del género *Staphylococcus aureus*

Dominio: Bacteria

Reino: Eubacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. aureus*^{1, 2}

2.2. *Staphylococcus*

Es un género bacteriano que incluye 40 especies. Son bacterias Gram positivas que se agrupan en racimos. Poseen una membrana citoplasmática simple con una pared celular formada por peptidoglicano.¹ Este se conforma por mureína , ácido teicoico y polisacáridos. Algunas especies pueden ser comensales o patógenos en la piel, así

como en las mucosas de los seres humanos y vertebrados de sangre caliente, asimismo se encuentran en el medio ambiente (agua, aire, alimentos). Son halotolerantes, algunas especies pueden resistir hasta un 20% de concentración de cloruro de sodio. La temperatura óptima del crecimiento y proliferación es de 30-37°C.³

2.3. *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* es una de las 40 especies en el género *Staphylococcus*. (**Tabla 1**) La mayoría de las otras especies sólo se encuentran en otros mamíferos y no infectan a los seres humanos.³ El médico alemán Anton Rosenbach fue el primero en describir brevemente esta bacteria en 1880, como un microorganismo sin capacidad de movimiento, mismo que crece en ramilletes. Actualmente se conoce que el *Staphylococcus aureus*, es una bacteria esférica de 0,5 a 1 µm de diámetro, Gram positiva, inmóvil (sin flagelos), no formadora de esporas, no encapsulada, con una morfología de cocos que se agrupan en forma de racimos de uvas, al contrario de los *Streptococcus* que forman cadenas. Tiene el distintivo de ser un anaerobio facultativo, debido a que se puede encontrar normalmente en la piel y en membranas, sean estas mucosas o epiteliales, tal es así que un buen reservorio por su humedad y temperatura son las fosas nasales.^{4,5}

2.3.1. Etimología

El *Staphylococcus aureus* lleva su nombre del latín *staphylé* en “**racimos**” y *coccus* refiriéndose a “**bayas**”, que al crecer en cultivos agar sangre forma colonias de color amarillo-dorado, debida a la producción de un pigmento carotenoide, de allí su

nombre *aureus* que significa “oro” (*Figura 1*); término acuñado por Alexander Ogtson en 1880. A quien se le acredita como el descubridor oficial de esta bacteria.^{3,2}

2.3.2. Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Staphylococcus*

Para la identificación se pueden realizar pruebas bioquímicas basadas en características generales propias del género *Staphylococcus*⁶⁻⁸

- Poseen catalasa (catalasa positivo). Esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno molecular. Esta es una diferencia esencial con los estreptococos que no la poseen.
- Ausencia de oxidasa (Oxidasa negativo)
- Fermentan la glucosa pero no son productoras de gas, como los estreptococos y otros aerobios.⁶

2.3.2.1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. aureus*

Las pruebas bioquímicas específicas para la identificación de *S. aureus* incluyen:

- Presencia de coagulasa (Coagulasa positivo). Esta es una enzima que puede ser secretada por el microorganismo (exoenzima) capaz de coagular el plasma sanguíneo catalizando la transformación del fibrinógeno en fibrina.⁹
- Presencia de Proteína A (Proteína A positivo)^{10,11}
- Crecimiento en medio agar manitol salado (Manitol-sal positivo). Este medio contiene una alta concentración de NaCl (10%-7%), además, es selectivo para Gram positivas que poseen coagulasa. *S. aureus* es capaz de metabolizar el manitol presente en el medio de crecimiento generando subproductos

ácidos que reducen el pH del medio. Adicionalmente, el medio tiene como componente rojo-fenol que cambia de rojo a amarillo en pH ácidos, por lo que *S. aureus* presentan un halo amarillo brillante, mientras que otras especies de *Staphylococcus* presentan coloración rojiza.⁹

- Presencia de proteína de unión al fibrinógeno (Proteína de unión al fibrinógeno positivo). Esta proteína permite que *S. aureus* se adhiera sobre el fibrinógeno del plasma para crear una protección de fibrina.⁹
- Presencia de DNAasa y termnonucleasa (DNAasa y termnonucleasa positivo) Estas enzimas catalizan la hidrolisis ácidos nucleicos (DNA y RNA).⁹

2.3.3. Pruebas para la identificación genética de *S. aureus*

2.3.3.1. La identificación del gen *nuc*

Este gen fue descrito por Odd G. Brakstad, Kjetill Savac and Johan Maeland, en “Detection *Stahlylococcus aureus* by Polimerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene”, en el *Journal of Clinical Microbiology*, en Julio 1992. Este gen es propio de esta especie y codifica la nucleasa termoestable presente únicamente en *Staphylococcus aureus*. Se puede usar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una secuencia conservada del gen. Luego por medio de electroforesis en agarosa se puede visualizar la banda que tiene aproximadamente 270 pares de bases.^{12,13}

La amplificación del gen *nuc* es un potencial test para el diagnóstico rápido de infecciones por *S. aureus*. Se puede realizar esta prueba directamente en muestras

clínicas, incluyendo muestras de los pacientes con la terapia antimicrobiana en curso. La especificidad reportada es de alrededor del 99% y una sensibilidad que bordea el 90%.¹²

2.4. Factores de Virulencia

Aunque *S. aureus* fue reconocido hace sólo 130 años, con toda seguridad ha sido uno de los principales microorganismos asociados a infecciones, matando a los seres humanos durante miles de años.^{10,11,14-16}

Staphylococcus aureus tiene varios factores de virulencia (**Ver Cuadro 1**), uno de los más importantes es la presencia de la proteína A en la pared celular que le protege de la digestión ante macrófagos y leucocitos.¹⁰ La producción de coagulasa ayuda de sobremanera, interfiriendo en la formación de redes de fibrina, incluso, protege al microorganismo de la fagocitosis. También, puede producir una toxina extracelular llamada hemolisina, que es la encargada de destruir los glóbulos rojos de la sangre, es por esto que el agar sangre, el área que rodea las colonias es transferente, conociéndose como la zona hemolítica.¹⁰ Otra toxina importante es la leucocidina que otorga la capacidad de dañar la funcionalidad de los macrófagos y leucocitos.^{17,18} Estos microorganismos también pueden poseer superantígenos como la toxina asociada al síndrome de shock tóxico (TSST-1) y la toxina epidermolítica que puede desencadenar un cuadro de exfoliación epidérmica generalizada existiendo dos tipos la A y B.¹⁰ También puede producir enterotoxinas, que están asociadas a intoxicaciones alimentarias, estas tienen la característica de ser resistentes al calor.¹⁹ Estos son los factores más importantes, sin embargo, no todas

las cepas de *Staphylococcus aureus* tienen todas las toxinas descritas (**Figura 2**).^{11,20}

A continuación se explican los diversos factores de virulencia en la siguiente cuadro.²¹

Cuadro 1. Factores de Virulencia del *S. aureus*.

<u>FACTOR DE VIRULENCIA</u>	<u>FUNCIÓN</u>
MSCRAMM (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules).	Se conocen con el nombre de componentes microbianos de superficie que se adhieren a moléculas titulares. Es un complejo que media la adhesión a las células huésped, componente fundamental para la colonización. ^{2, 4, 16, 22–24}
Proteína A.	Es un componente importante de la célula de la pared. Se une a la región Fc de IgA e IgG, ejerciendo un efecto anti-opsonina y por lo tanto fuertemente antifagocítica. ^{2, 4, 16}
Proteína de unión a fibronectina.	Promueven la adhesión a células y matrices de tejido mucoso. ^{2, 4}
Proteína de unión al fibrinógeno.	Impide la unión de redes de fibrina y activación de factores de la coagulación. ^{22–24}
Factor de aglutinación.	Mejora la cohesión de los organismos en presencia de plasma. ²⁴
Cápsula.	Evade las defensas del huésped. ²⁴
Coagulasa.	Genera capa de fibrina protectora alrededor de <i>S. aureus</i> ^{2, 24}
Estafilocinasa.	Fibrinólisis. ²
Las proteasas.	Degradar proteínas antibacterianas y proteínas de la matriz. ²
Penicilinasas.	Producida por cepas resistentes al antibiótico penicilina, debido a que lo degrada. La capacidad de codificar esta enzima es a través del intercambio de plásmidos que contienen el gen. ^{23,24}
Las lipasas.	Promover propagación intersticial de microorganismos. ⁸⁷
Hialuronidasa.	Degrada ácido hialurónico – matrices de colágeno en los

	tejidos. ^{2, 22}
Fosfolipasa C.	Enzima asociada con cepas recuperadas de pacientes con distrés respiratorio del adulto y coagulación intravascular diseminada. Aparentemente los tejidos afectados por esta enzima se vuelven más susceptibles al daño y destrucción por componentes bioactivos del complemento y sus productos durante su activación. ^{2,4,16,22-24}
α –Hemolisina.	Destruye eritrocitos y lisa plaquetas. Es la toxina mejor estudiada. Se polimeriza en tubos que atraviesan las membranas, generando la pérdida de moléculas importantes intracelulares y eventualmente, desencadena la lisis osmótica. ²
β-Hemolisina.	Degrada esfingomielina / tóxico intracelular para las células. ²
Leuco - cidina/toxina.	Destruye a glóbulos blancos. ²
Panton-Valentine leucocidina.	Es formadora de poros en los PMN, provocando la lisis intracelular. La producción de esta toxina hace que las cepas sean más virulentas. Se produce predominantemente en cepas de origen extrahospitalario. ^{2,4,22-24}
Las exotoxinas / enterotoxinas. (Seis principales tipos antigénicos: A, B, C, D, E y G).	Enterotoxinas termoestables, capaces de estimular un efecto emético directamente en el centro del vómito, ubicado en el tronco encefálico. Producen intoxicaciones alimentarias, la aparición aguda, de corta duración y rápida recuperación. El período de incubación es generalmente de 1 a 6 horas. ^{5,9,22,25}

Los superantígenos por ejemplo: c o enterotoxina F y toxina Exfoliativa (A y B).	<p>Estimulan una mayor respuesta de los linfocitos T (como el 20 por ciento de las células T responden, en comparación con 0,01 por ciento responden a los antígenos procesados habituales).^{3,16,20} Mantiene alta afinidad por el complejo de histocompatibilidad tipo II, generando una masiva liberación en la circulación de grandes cantidades de citoquinas de células T, tales como interleucina-2 (IL-2), el interferón-γ (IFN-γ), y factor de necrosis tumoral-α (TNF-α).^{23,26}</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Síndrome de choque tóxico: Mediada por una toxina termoestable, capaz de inducir una reacción masiva inmunológica, se caracteriza por aumento de la permeabilidad endotelial y su efecto citotóxico generalizado.^{23,26} 2. Síndrome de la piel escaldada: La toxina escinde la desmogleína-1, que es un componente de los desmosomas (Estructuras especializadas para la adhesión célula a célula). La escisión origina pérdida de la capa superficial de la piel.^{3,26}
---	--

***Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.**

2.5. Colonización

Staphylococcus aureus es uno de los comensales habituales del ser humano, y a la par, constituye la causa más frecuente de infecciones clínicas.¹ Uno de los primeros reportes acerca de investigaciones de portadores de esta bacteria se realizó en 1931 por Danbolt.^{1,27} Al incrementarse la incidencia en 1947, Danbolt describió que esta bacteria habita en la piel y mucosas de seres humanos y animales.²⁷⁻²⁹ El sitio más frecuente de colonización, son las narinas anteriores. Otros lugares en el organismo incluyen el periné, faringe, tracto gastrointestinal, vagina y axila.²⁷⁻²⁹ Varios estudios longitudinales han tratado de demostrar la razón por la que *Staphylococcus aureus* alcanza la nariz, existiendo varias vías de transmisión, tales como la vía aérea

y la de contacto, confirmando que esta última es la que más se asocia con el hecho constante de hurgarse la zona del vestíbulo nasal (como se definió originalmente “Nose picking zone”).^{1,23,30} Constituye, una vía directa de auto-inoculación, siendo la mucosa nasal el nicho ecológico ideal del *S. aureus*, ya que es un sitio con humedad, ventilación y temperatura cálida, apropiada para su crecimiento.²⁷⁻²⁹

2.5.1. Defensa nasal

Se ha identificado que a nivel de la mucosa de las narinas la inmunidad innata desempeña un rol fundamental, al contribuir con la secreción de inmunoglobulina A y G, lisozima y lactoferrina, que son bacteriostáticos.²⁷⁻²⁹ que junto a la inmunidad humoral incrementa concentraciones de alfa-defensinas y mediadores de la inflamación como quimiotácticos, como respuesta contra la colonización de *S. aureus*, sin embargo, esta es inefectiva ya que no representa suficiente actividad bacteriostática ni bactericida.^{24,27,31} (**Figura 4**)

2.5.2. Patogenia

S. aureus puede residir en los tejidos superficiales o tegumentarios, sin causar ningún daño, este estado se llama colonización.¹⁶ Sin embargo, esta bacteria puede volverse infecciosa.^{2,16} por lo que se han descrito tres factores que facilitarían su ingreso:

- La unión a las células de la mucosa nasal, mediada por los ácidos teicoicos a la mucina de la mucosa nasofaríngea.^{20,32-34}
- La adherencia al tejido tegumentario por pequeñas disrupciones o traumas directos que generan discontinuidad en la piel.^{20,32-34}

- La adherencia del *S. aureus* a las células endoteliales, a través de las proteínas de unión a la fibronectina, fibrinógeno y matriz, descritas en el cuadro anterior. **(Ver Cuadro 1).**^{20,32-34}

Una vez que la bacteria atraviesa la defensa muco-cutánea, se hospeda a nivel tisular, por su pronta diseminación forma abscesos, uno de los estados infecciosos más comunes de este microorganismo.^{35,36} Sin embargo, algunas veces el germen puede seguir irrumpiendo, buscando planos más profundos y de preferencia sin irrigación.^{35,36} Ante el fracaso del sistema inmunológico las colonias llegan al torrente sanguíneo, se diseminan y producen focos de infección a distancia.¹⁴ **(Figura 3)**

Es así como, de infecciones por *S. aureus* de piel y partes blandas, se pueden producir infecciones invasivas como endocarditis, meningitis, sepsis, osteomielitis, bursitis, artritis, erisipela, celulitis, entre otras.^{17,26,35,36}

2.6. Resistencia a la meticilina

2.6.1. Historia

El descubrimiento de la Penicilina, por Alexander Fleming en 1928, dio nuevas esperanzas en el tratamiento de enfermedades infecciosas, de hecho se enfocó en el uso contra *S. aureus*. La penicilina se implantó entre las décadas de 1930-1940, no obstante las bacterias adquirieron ágilmente la enzima β -lactamasa (**penicilinasa**), una enzima que es capaz de escindir el fármaco, haciéndolo inofensivo. Hasta la década de 1950, la resistencia a la penicilina fue generalizada, evidenciándose los primeros brotes a nivel nosocomial.³⁷ Poco después, las cepas de origen comunitario

demandaron la utilización de antibióticos alternativos para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*.³⁷

A finales de 1950, en Europa se emite un reporte de resistencias tanto hospitalarias y comunitarias de *Staphylococcus* sp., manejando tasas de resistencia a la penicilina de 90% y 70%, respectivamente.^{2,6,16} Al presente, más del 95% de las cepas de *S. aureus* que son los causantes más frecuentes de infecciones por todo el mundo, ya no se tratan con penicilina.^{16, 17}

Esto llevó al desarrollo de nuevas estructuras antibióticas. Alrededor de 1960, se amplía el anillo 6-aminopenicilánico permitiendo de esta manera resguardar el precursor del anillo β -lactámico, ofreciendo resistencia a la acción de las β -lactamasas.^{23,38,39} A esta penicilina semisintética se la llamó **METICILINA**, que tiene un análogo idéntico conocido como **OXACILINA** en Brasil. Poco tiempo después se empezó a informar resistencia a la meticilina, existiendo un aumento en el número de cepas en la década de 1970 y 1980, siendo los principales brotes de infecciones resistentes en los Estados Unidos, Inglaterra, y muchos otros países industrializados.^{38, 39}

Paralelamente, en la década de 1980 surgieron los primeros aislamientos de infecciones causadas por *S. aureus* en pacientes sin factores de riesgo de exposición de MRSA nosocomial (HA-MRSA), dando lugar a la designación de CA-MRSA (adquirida en la Comunidad). Afirmándose en la década de 1990 un incremento de la colonización asintomática de CA-MRSA.^{38,39} Se identificó que estas cepas presentaban genes que codifican la síntesis de la **Leucocidina Panton-Valentine**

(PVL), una toxina de gravedad en las infecciones de tejidos blandos como también en la neumonía.^{19,40,41}

Así al término del siglo XX, el MRSA en los hospitales habría aumentado de 2.4% de 1975 a 35% en 1996. Actualmente los hospitales advierten que más del 80% de las cepas de *S. aureus* aisladas, son MRSA.^{38, 39} (**Figura 5**)

A inicios del siglo XXI, se definen los criterios para identificación clínica de CA-MRSA:

- Presentar un cultivo positivo para MRSA, tomado al ingreso y que se confirme dentro de 48 horas después de su estancia hospitalaria. Además descartan factores de riesgo nosocomial.^{35,42,43}
 - No haber sido hospitalizado en los últimos 12-24 meses, ni haber recibido atención sanitaria en ningún nivel de salud o intervenciones como: Diálisis, cirugía, catéteres, implantes.^{35,42,43}
- El mal uso o abuso de antibióticos, con esquemas incompletos en los últimos 3 meses.^{35,42,43}

Los brotes de infecciones causadas por CA-MRSA están aumentando globalmente y en todas las edades. Alrededor del 2005, ^{6,7,21,34} varios países informaron de su presencia como un patógeno emergente, incluyendo los Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, diferentes países de la Unión Europea y en Sudamérica como Brasil, Uruguay y Colombia^{37,38,44} En Brasil hay varios informes de aislamientos que confirman la presencia de este patógeno en la comunidad como causas de forunculosis, infecciones en tejidos blandos con complicaciones sépticas y neumonías graves.^{21,34.}

En 1958 la FDA aprueba el uso de vancomicina,^{37,38} para el tratamiento de MRSA. A finales de la década de los 80's, se informan sobre las primeras cepas de *Enterococcus faecium* aisladas en hospitales en Francia, que presentan patrones de resistencia a la vancomicina.⁴⁵ En 1988, *Uttley et al.*, fueron los primeros en reportar resistencia a la vancomicina en *E. faecalis* y *E. faecium* en Reino Unido.^{11,43,46-50} A principios de 1990, las infecciones por *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (**VRE**) tenían un efecto sustancial en los hospitales del Noreste y Oeste de los Estados Unidos. En 1993 el 7,9% de las muestras de *Enterococos* en ambientes nosocomiales eran VRE notificados por el CDC.⁴⁶⁻⁵⁰

La vancomicina ha sido y es el agente terapéutico más confiable contra las infecciones causadas por MRSA. Sin embargo en 1996, el **Dr. Keiichi Hiramatsu** en el Japón, reporta a nivel hospitalario la primera cepa de MRSA en adquirir resistencia a la vancomicina, esta fue aislada en un paciente que contrajo una infección postoperatoria.^{17,38,50-52} A mediados de la primera década de los 2000, se informó sobre varios aislamientos de resistencia a la vancomicina en *S. aureus* (**VRSA** por sus siglas en ingles) en EE.UU, Francia, Corea, África del Sur y Brasil.^{50,51}

2.6.2. Resistencia hospitalaria y comunitaria.

El Centro de control de las enfermedades y prevencion de los Estados Unidos (CDC) categoriza como MRSA nosocomial (HA-MRSA) a aislamientos de *S. aureus* en personas que: han tenido contacto frecuente o reciente con los hospitales o centros de salud (tales como hogares de ancianos o centros de diálisis) en los últimos 12

meses, han sido objeto recientemente de un procedimiento médico invasivo, o el mal uso o abuso de antibióticos en los 3 últimos meses.^{37,53–56} La adquisición de MRSA asociado a la comunidad carecen de todos los factores nosocomiales^{53,54} (*Ver Cuadro 2*). Aunque HA-MRSA y CA-MRSA tienen diferencias clínicas, ambos se transmiten de la misma manera, con mayor frecuencia a través del contacto directo de piel a piel y/o contacto con elementos o superficies contaminadas.^{54–56}

Cuadro 2. Principales características y diferencias entre HA-MRSA y CA-MRSA.

MRSA nosocomial. (HA-RSA)^{15,23}	MRSA adquiridas en la comunidad. (CA-MRSA).⁵⁸
Resistentes a múltiples antibióticos. ^{37,54}	Resistentes por lo general a β -lactámicos e infrecuentemente a macrólidos. ^{37,54,57}
Factores nosocomiales: Hospitalizaciones últimos 24 meses, estancia en Unidad de Cuidad Intensivos, realización de procedimientos invasivos como sondas o catéteres, cirugías recientes, y/o cualquier tipo de diálisis. ³⁷	Aislamientos en pacientes que no tienen factores de riesgo nosocomial. ¹⁵
Producen una gran cantidad de procesos infecciosos graves: 5's : ^{37,54,57,58} <ul style="list-style-type: none"> • Sepsis. • Sitio de cirugía. • Infección sitio de inserción. Ejemplo: de catéteres o dispositivos intracavitarios. • Bacteriemia (Blood Stream). • Infecciones oportunistas por compromiso del Sistema inmunológico. 	Producen principalmente infecciones en la piel, tejidos blandos, y existen reportes frecuentes de neumonía necrotizante. ¹⁵
No tiene grupo etario específico, sin embargo los más susceptibles son las edades extremas. Su diagnóstico de infección por HA-MRSA se identifica a partir de las 48 horas de ingreso. ¹⁵	Pacientes adultos, aparentemente sanos. En el caso de infección el diagnóstico de CA-MRSA se identifica como una causa reciente, menor de 48 horas de ingreso hospitalario. ¹⁵

***Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.**

2.6.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en el *S. aureus*

Hay tres formas generales en que las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos. Impiden el ingreso de las drogas a nivel intracelular, cambio conformacional del fármaco de modo que no afecta a las bacterias, y modificación del sitio diana de la droga, sin proporcionar efecto alguno.^{8,16,44,59} (**Figura 6**)

Primer mecanismo:

Disminución de la concentración en el espacio intracelular bacteriano.

La baja del total de la droga que está presente en la célula bacteriana es una habilidad muy práctica que aumenta la supervivencia de los microorganismos. Esta estrategia es tan eficaz que las bacterias han desarrollado diferentes componentes para reducir la cantidad de medicamento que ingresa.^{10,43}

El MRSA presenta una membrana plasmática con poros, muchos antibióticos llegan a nivel intracelular por estos agujeros, por lo que las bacterias disminuyen el número de poros. En consecuencia, existe insuficiente droga como para perjudicar a las bacterias.^{43,44,59}

Adicionalmente otro mecanismo que disminuye la concentración de antibiótico, son los sistemas de reflujo, son bombas que eliminan el principio activo, evitando una eventual avería intra-plasmática.^{43,44,59} Existen tres tipos de bombas:

- Específicas para una droga

Tercer mecanismo:

Variación del sitio de acción (diana).

Las bacterias han desarrollado otro conjunto de estrategias, donde transforman el sitio de acción del antibiótico.^{22,57,60} Existen varios mecanismos:

- CONFIGURACIÓN RIBOSOMAL: El ribosoma es un componente bacteriano que produce proteínas y su funcionamiento es esencial para el crecimiento y supervivencia bacteriana. Existen bacterias que alteran la estructura genética ribosomal, por medio de mutaciones que lo hacen indemne al ataque de los antibióticos.^{22,57,60}
- RECEPTORES: Son proteínas ubicadas en la pared celular que entran en contacto con el antibiótico, lo capturan y/o no permiten su ingreso dentro de la bacteria. Son vías secundarias que impiden la llegada al sitio de acción, como el *S. aureus* que posee proteínas de unión a la penicilina, como la PBP-2A (Codificada por el gen *mecA*).^{60,61}
- HIPERPRODUCCIÓN MOLECULAR: Es una manera efectiva que las bacterias utilizan para protegerse, consiste en aumentar la producción de la molécula diana. Consecuentemente, teniendo más moléculas afines presentes, se necesitará más antibiótico para frenar el funcionamiento bacteriano.⁶⁰ En este caso el antibiótico llega intacto y puede bloquear proporcionalmente una molécula de proteína bacteriana, sin embargo al presentarse cinco moléculas se demandaría cinco veces más de antibióticos a nivel intracelular.⁶⁰ Es un mecanismo eficiente, ya que no siempre se puede aumentar la cantidad de fármaco administrado a los pacientes. Esto es

debido a las limitaciones físicas de la absorción y el riesgo de toxicidad por sobredosis.^{17,36,57}

2.6.4. Mecanismos de transferencia genética

Los genes de resistencia pueden estar presentes en el cromosoma, o en los plásmidos.^{8,16} Cuando la población de bacterias está expuesta al antibiótico, las bacterias resistentes poseen una ventaja selectiva. Estas bacterias sobreviven al tratamiento con antibióticos, mientras que las bacterias susceptibles mueren.^{3,63,64} Las bacterias supervivientes que tienen los genes de resistencia, ahora pueden dividirse y repoblar con bacterias con las mismas características. Así, la exposición a los antibióticos en esquemas incompletos, favorece la supervivencia de bacterias resistentes.^{63,64} La exposición continua a los antibióticos proporciona una presión selectiva para mantener los genes de resistencia dentro de una población de bacterias.⁶³

La conjugación bacteriana es uno de los principales mecanismos para la propagación de resistencia a antibióticos, este mecanismo es conocido por algunos autores como el apareamiento bacteriano.⁶³ Una célula (la célula donante) forma un tubo largo (llamado pilus sexual) que se extiende y se une a otra célula (la célula receptora), y conecta a las dos células bacterianas. Durante la conjugación, el ADN contenido en el plásmido conjugativo es transferido desde una bacteria a otra.^{5,12} Para que un evento de recombinación entre el ADN del plásmido y el ADN cromosomal ocurra, este debe romperse y luego re-unirse para incluir el nuevo ADN en el genoma de la

bacteria.⁶⁴ La célula donante copia sus plásmidos y envía una copia a la célula receptora antes de que las bacterias se disgreguen.^{57,62} Una vez que el plásmido está presente en la segunda bacteria, puede convertirse en un donante también y pasar el plásmido a más bacterias. Cuando el plásmido contiene genes de resistencia a antibióticos, este proceso da como resultado la propagación de la resistencia entre las dos bacterias. Todo este proceso puede llevarse a cabo en cuestión de minutos y puede dar lugar a la rápida propagación de plásmidos de resistencia.^{63,64}

Los transposones son otro elemento genético importante que facilita la movilidad entre bacterias de genes de resistencia.^{4,35,65} Los transposones son pequeños fragmentos de ADN que se encuentran en los cromosomas o en plásmidos. Estos fragmentos tienen la capacidad de trasladarse de un lugar a otro en el genoma, es decir, “saltan” del cromosoma al plásmido o viceversa cambiando su ubicación. Cuando los genes de resistencia se incluyen entre estos elementos transferibles, su propagación es mucho mayor.^{35,65}

2.7. Genética de la resistencia en *S. aureus*

2.7.1. Gen *mecA*

El gen *mecA* tiene 533 pares de bases, y cumple la función de codificar una proteína ligadora a penicilina (PBP) designada PBP-2A.^{37,66–68} *S. aureus* produce normalmente cuatro tipos de proteínas ligadoras a la penicilina. Estas enzimas están ancladas en la membrana citoplasmática y tienen como función el ensamblaje y el control de las últimas etapas de la biosíntesis de la pared celular. Estas cuatro PBP son susceptibles a la transformación por los antibióticos β -lactámicos, conduciendo así a la inhibición de la síntesis de la pared celular y la muerte bacteriana.^{37,66} La

PBP-2A es antagónica a la acción de todos los antibióticos β -lactámicos disponibles, tiene baja afinidad a esta clase de antimicrobianos, lo que explica la resistencia.³⁷

El gen *mecA* está regulado por dos genes *MECI* y *mecRI*.^{69,70} Además está controlado por un gen represor *mecI*. En ausencia de los antimicrobianos β -lactámicos, el *mecI* reprime la expresión del gen *mecA* y *mecRI-MECI*. Sin embargo, en la presencia de antibióticos β -lactámicos, el gen *mecI* se escinde autocatalíticamente; permitiendo, la transcripción del gen *mecA* y la posterior síntesis de PBP-2A.^{8,28,32} (**Figura 7**)

Se han descrito, otros factores cromosómicos implicados como los genes que sintetizan las proteínas **femXAB** (factores esenciales de expresión de resistencia a meticilina).^{71,72} *Giannouli et al.*, atribuyen a estos genes las respuestas atípicas de resistencia frente a la meticilina en cepas *mecA* negativas. Han destacado la importancia del papel de la familia femXAB en la formación de los puentes de pentaglicina que consolidan las cadenas de peptidoglicano en *S. aureus*. Con esto es innegable, que el gen *mecA* no es un determinante absoluto de la resistencia a la meticilina.^{71,72}

2.7.2. Patrones de resistencia a la vancomicina

La resistencia a la vancomicina se produce por la presencia de genes *van* (identificados con letras desde la A hasta la G)^{47,60} que codifican para la síntesis de peptidoglicano por una vía alternativa que produce una pared más gruesa, impidiendo de esta manera que la vancomicina entre al medio intracelular.⁶¹ De acuerdo a un cambio conformacional, el residuo *D-alanil-D-alanina* del monómero

mureína se sustituye por un péptido *D-alanil-D-lactato*, a la que la vancomicina no tiene afinidad y posteriormente se inactiva frente a las cepas portadoras.³⁵ (**Figura 9**).

2.7.3. Papel de la Leucocidina Panton-Valentine (PVL)

Las leucocidinas son proteínas solubles y después de someterse a un cambio estructural, se convierten en proteínas integrales de membrana.¹⁷ La familia de las leucocidinas consiste en toxinas estafilocócicas, utilizadas para formar poros en las membranas celulares de las células del huésped y absorber nutrientes que la bacteria infectante necesita para su metabolismo.^{17,21,73} Varios miembros de la familia han sido aislados de bacterias patógenas, la mayoría *estafilococos*, pero también de *Clostridium* y *Bacillus*.³⁷ El primero en ser caracterizado fue el complejo de la Leucocidina Panton-Valentine, (PVL).³⁷ Responsable de las infecciones profundas de la piel y tejidos blandos, tales como forúnculos, abscesos, neumonía necrotizante, que presenta hemorragia pulmonar, necrosis extensa en los septos alveolares, con la destrucción de epitelio de los bronquios y los bronquiolos²¹ con zonas necróticas en la mucosa de la tráquea.⁷³ Encontrándose en infecciones por CA-MRSA con los genes que codifican la producción de PVL.⁷³

La PVL fue descrita por primera vez como "leucocidina sustancial" por *Van de Velde* en 1894, pero se asoció por primera vez con la piel e infección en tejidos blandos, por Panton y Valentine en 1932. La configuración, es un hecho debido a la transducción de dos genes, *Luk-s* y *Luk-f*, que se ensamblan sinérgicamente para formar un heptámero de 1410 pares de bases.⁴³

Estas proteínas se unen a receptores específicos en los polimorfonucleares, macrófagos y células epiteliales. En altas concentraciones de la toxina la bacteria

puede incrustarse en la membrana de la célula huésped y formar un poro y empezar la lisis celular.^{4,7,51,74,75} Pero a bajas concentraciones de PVL, esta ingresa y disrumpe el funcionamiento mitocondrial e induce la cascada de caspasas, que desencadena la apoptosis celular.^{74,75} (**Figura 8**)

La importancia clínica ha sido estudiada por *Gillet et al.*, quienes encontraron tasas alarmantes de supervivencia en pacientes con neumonía por MRSA. A las 48 horas del ingreso hospitalario los portadores de cepas que expresaban PVL era del 63%, mientras que, para pacientes infectados con cepas que carecían la toxina era de un 98%.^{4,43,76}

2.8. Métodos de diagnóstico específicos de MRSA

2.8.1. Identificación Fenotípica en medios de cultivo

El CHROMagar MRSA® se utiliza para el cultivo de *S. aureus*, permite el crecimiento de cepas MRSA produciendo colonias de color rosa malva. A pesar del alto costo, este método tiene una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%.^{48,77}

Otro medio es la prueba de difusión en disco antibiótico, en agar manitol-salado, que ha probado resultados favorables en la detección de la resistencia a la meticilina, siendo un método eficaz y relativamente más barato.¹⁵

2.8.2. Vitek2 Compact®

Es un sistema automatizado de identificación de especies y estudio de sensibilidad antimicrobiana.⁵⁸ La identificación esta mediada por la inyección de una

concentración de microorganismos en tarjetas diminutas, con determinados paneles de reacciones bioquímicas. Este sistema realiza la identificación a través de un método colorimétrico.⁶⁶ La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar con soluciones normalizadas de diferentes antibiótico, que se leen con respecto a los valores de corte de sensibilidad establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, siglas en inglés).⁷⁸ Este sistema, utilizando el espectrofotómetro tiene la capacidad de establecer en un tiempo promedio de seis horas los patrones de susceptibilidad antimicrobiana.⁷⁹

2.8.3. PCR

El uso de técnicas moleculares como la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR** por sus siglas en inglés). Esta es una de las técnicas más precisas para la identificación de MRSA.⁵³ El reciente desarrollo de la PCR en tiempo real se ha habilitado como una prueba fiable y rápida de tipificación, caracterización y cuantificación de los aislados clínicos, además apoya la selección y aplicación de las estrategias de control de infecciones, incluyendo el uso apropiado de antibióticos.⁷ En cotejo con los métodos de cultivo y pruebas de sensibilidad estándar que pueden tardar de 48-96 horas, este método permite disminuir los tiempos de reporte en el laboratorio para identificación de cepas MRSA.^{40,80-82}

2.9. Resistencia a los antibióticos en el Ecuador

2.9.1. Uso inadecuado de antibióticos

Esta descrito que las bacterias son causantes de una amplia gama de infecciones tanto en humanos como en animales,³⁷ por lo que es necesario el adecuado uso de antibióticos para su manejo,³⁹ tanto en la medicina humana como en la veterinaria. Si bien la distribución de los antibióticos para humanos es regulada aparentemente, se ha reportado muchos casos del abuso de antibióticos en infecciones virales.^{23,31}

La agropecuaria y la veterinaria, poseen la misma problemática, primero porque existe una libre distribución de antimicrobianos, por su venta libre mayormente en los sectores rurales donde los cuidadores de ganado adquieren consultando por el síntoma de un animal,⁴⁶ en vez de acudir al veterinario, y en segundo plano está en que no se completa un esquema adecuado, ya que suspenden el tratamiento cuando ha desaparecido el síntoma.^{23,31}

Esta descrito en el 2006 que el gasto en la ganadería de antibióticos, bordeó los US\$ 4'409.886. (Fuente IMSC – Edifam), estos fármacos no solo se utilizaron para tratar infecciones bacterianas sino también para prevenirlas, siendo motivo de debate, y por último, también se ha reportado que en mayor parte los antibióticos han sido utilizados como promotores de crecimiento especialmente en la cría de aves y cerdos.^{23,31,37} El fundamento es que se ha comprobado que el suministro continuo de ciertos antibióticos a dosis subterapéuticas vía oral, permite el control de bacterias Gram positivas que colonizan el intestino animal.⁸³ De esta manera, este tipo de productos, favorecen la absorción de más nutrientes con el fin de establecer un crecimiento equilibrado, acorde con el alimento recibido.^{7,21,83}

Los antibióticos usados como promotores de crecimiento es el que más interrogantes presentó éticamente y al que incluso se le ha culpado de producir resistencia bacteriana.^{37,7} Es por eso que en otros países se ha prohibido el uso total de antibióticos como promotores de crecimiento o de al menos de aquellos similares que se prescriben en la terapéutica en la medicina humana.^{7,21,83} (*Ver Cuadro 3*)

Cuadro 3. Antibacterianos de uso en la medicina humana y su equivalente en la medicina veterinaria

Antimicrobianos	
Terapéutica medicina humana	Semejante en medicina veterinaria
Amoxicilina	Amoxicilina
Ampicilina	Ampicilina
Avoparcina	Vancomicina
Cefalexina	Cefalexina
Ceftriaxona	Ceftiofur
Ciprofloxacino	Ciprofloxacino, enrofloxacin
Cloxacilina	Oxacilina
Estreptomicina	Estreptomicina
Penicilina	Penicilina
Quinupristina	Virginiamicina
Tetraciclina	Tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina
Trimetoprima/Sulfametozasol	Trimetoprima/Sulfametozasol

*Tomado del Libro, Resistencia antimicrobiana en el Ecuador. Zurita J. y Gómez A. 2006.⁸³

2.9.2. Transferencia de resistencia antimicrobiana de animales a humanos

Hoy por hoy, se conoce que los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos no difieren entre humanos y animales,^{21,83} se plantea que la administración de antibióticos ejerce una presión selectiva sobre la población de bacterias dentro de las cuales se encuentran algunos individuos mejor adaptados (resistentes).⁸³⁻⁸⁶

Por lo que cualquier aislamiento bacteriano resistente en animales puede ser potencialmente contagioso para la especie humana. Eventualmente esto puede llevar a la aparición de una infección causada por una bacteria, que posea genes de resistencia de origen animal, es decir que estos genes se hayan seleccionado por el uso de antibióticos en animales.^{85,86} Existen varias vías de transmisión:

1. Por la presencia de bacterias resistentes en los tejidos animales que pudieran transferir su información genética a las bacterias presentes en el intestino humano a través de la cadena alimentaria.⁸⁵⁻⁸⁸
2. Por la bioacumulación en los residuos ganaderos (estiércol) con los problemas de contaminación ambiental de suelos y aguas.⁸⁵⁻⁸⁷
3. Por contacto estrecho, al transferirse las bacterias directamente colonizando y transfiriendo la resistencia a flora bacteriana comensal en los humanos.⁸⁵
4. Por contacto indirecto con las superficies y el polvo de las granjas.^{47,55}

2.10. MRSA y su relación con el ganado porcino

Como se ha tratado, la transferencia de MRSA puede darse entre personas y animales en contacto estrecho.^{87,88} Se ha descrito que un tipo de MRSA comunitario, el complejo clonal o linaje clonal 398 (**CC398**) ha estado presente entre el ganado porcino y el humano.^{49,62,64,89}

Los **complejos clonales**, se definen como miembros de un grupo que genéticamente son similares (genotipo) con un mismo origen, que se distinguen por su variación en la localización de sus genes. Se ha estudiado que el linaje de MRSA-CC398 es el que está estrechamente más asociado al cerdo y constituye una particular

inquietud.^{4,41,73,90} Esta cepa que fue descrita en el 2003 se ha propagado ampliamente entre el ganado porcino de varios lugares. Uno de los primeros reportes, fue referido en Holanda donde se lo cataloga como zoonosis.⁹¹⁻⁹³ En varios lugares del mundo como Norteamérica y el Sudeste asiático, han estudiado que esta línea de MRSA - CC398, puede colonizar al ganado porcino y a sus cuidadores, sin generar síntoma alguno en ambas especies. Además, se afirma que existen también otros tipos de ganado que pueden ser colonizados con MRSA como el bovino, avícola, vacuno.^{65,88,94}

Los estudios de prevalencia de MRSA del linaje CC398, varían de acuerdo a la ubicación. Por ejemplo los valores emitidos en Europa de portadores varían entre 1.3% de cerdos muestreados en Suiza hasta prevalencias del 40% de cerdos muestreados en Bélgica y los Países Bajos.^{90,95} En muchos países que han hisopado ganado porcino como en Alemania la prevalencia oscila entre el 49% y 80%. En Canadá, un estudio informó que 25% del ganado porcino y 45% de las granjas evaluadas estaban colonizadas con MRSA.^{4,96,97}

2.11. Transferencia de MRSA a polcicltures

Numerosos estudios reportan que las personas que viven o trabajan en granjas de cerdos, incluidos los agricultores y sus familiares, como también veterinarios y trabajadores de mataderos, están en mayor riesgo de ser colonizados por MRSA.^{90,91} En Bélgica, el 37,8% (48/127) de las personas que trabajan o viven en 25 de las 49 granjas investigadas fueron portadores de MRSA del linaje del CC398.⁹²⁻⁹⁴ Otro estudio informó que el 9,5% (14/146) de cuidadores belgas que participaron tuvieron

una prevalencia de 7,5% (11/146) de MRSA. Por otra parte, *Van Cleef et al.*, en el año 2010, informó que 5,6% (14/249) de los trabajadores con ganado porcino, fueron MRSA-positivo.^{35,87,98}

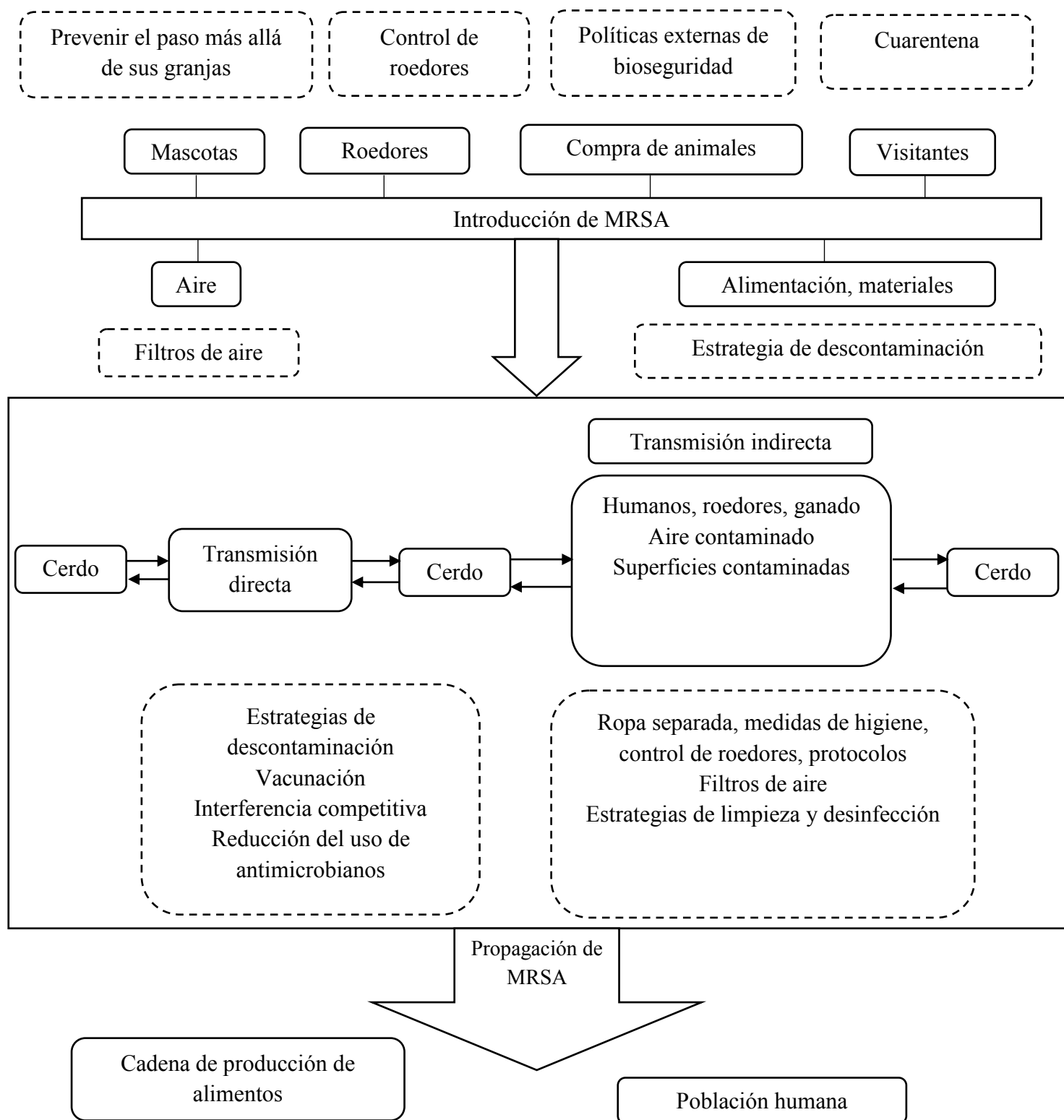
Aunque las rutas exactas de transmisión entre cerdos y seres humanos no se han esclarecido todavía, es probable que, a transmisión se produzca por contacto directo e indirecto (aire, superficies y/o medio ambiente contaminado).^{30,99,100} (**Ver Flujograma 1 y 2**) Más aún, la presencia de MRSA en los seres humanos se ha asociado con la intensidad de contacto con los animales y su entorno. Por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar los factores precisos de MRSA para colonizar a los seres humanos.^{98,99}

Existe evidentemente, la obligación de evaluar el riesgo de transmisión fuera del ámbito hospitalario (es decir, en la comunidad saludable).⁹⁹ Ya que se ha descrito que es un potencial patógeno causante de infecciones en piel así como abscesos profundos, celulitis, fascitis necrotizante y endocarditis. Sin embargo, estos datos deben ser interpretados con cautela debido a que la incidencia de estas infecciones por esta bacteria es muy baja. Por lo tanto, es prudente seguir investigando acerca del comportamiento del MRSA con centros de control que deben estar continuamente alertas.^{43,95,101}

Transmisión directa	Transmisión indirecta
Cerdo ↔ Humano	Cerdo ↔ V ↔ Cerdo
<ul style="list-style-type: none"> • Contacto 	Vectores <ul style="list-style-type: none"> • Humanos (ej. granjeros, veterinarios) • Animales de compañía • Otro tipo de ganado • Roedores • Trasmisión por aire • Materiales contaminados. • Comida, agua, ambiente contaminado.

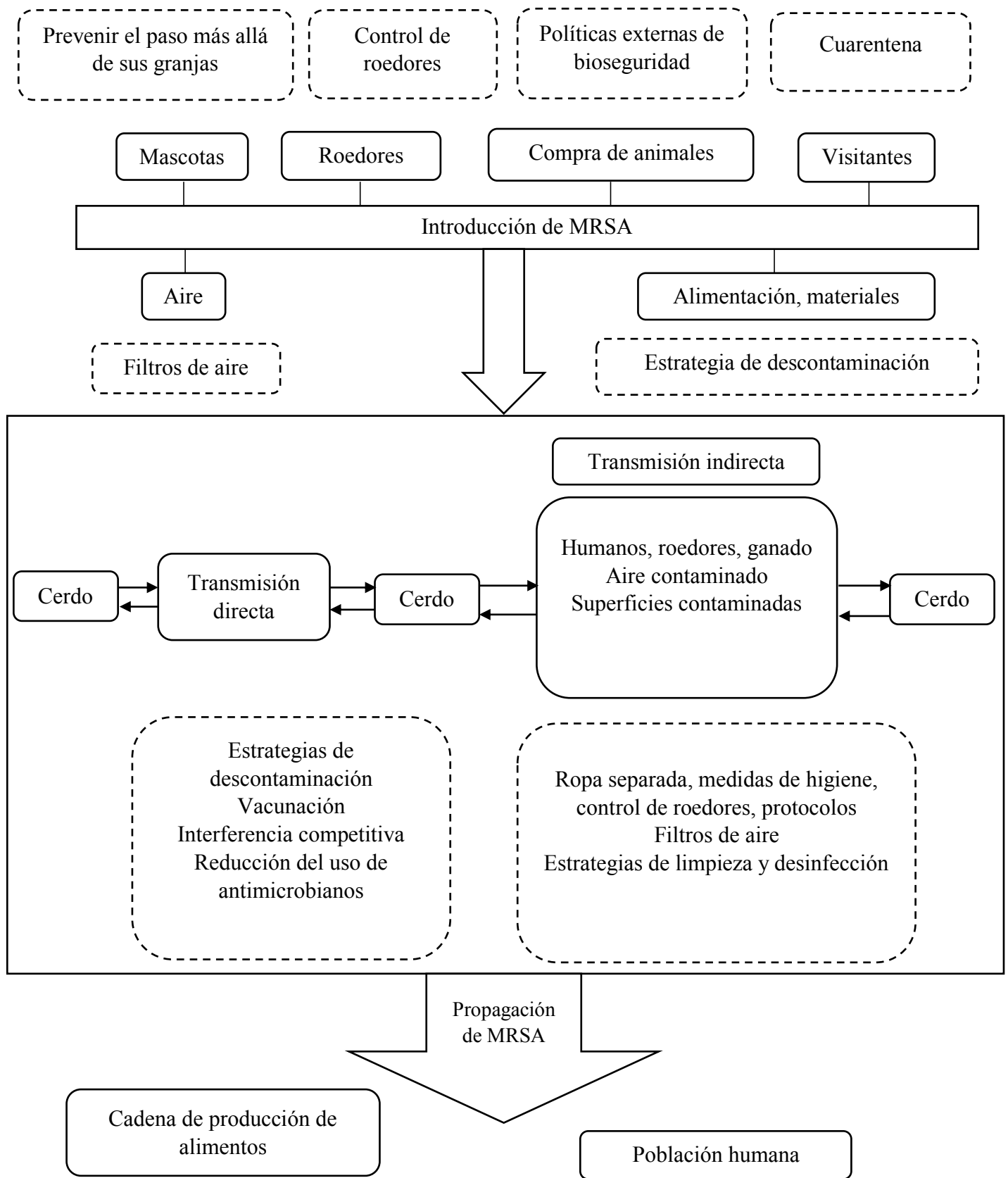
***Realizado por Sebastián Rivadeneira**

Flujograma 1. Revisión esquemática de las rutas potenciales de transmisión de MRSA entre cerdos. (Traducido y modificado por Sebastián Rivadeneira, Esquema que ha sido tomado del artículo de “Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs” de Crombé F.^{101–103})



***Realizado por Sebastián Rivadeneira**

Flujograma 2. Representación esquemática de las posibles rutas de transmisión de MRSA (línea continua) y estrategias de intervención teórica (línea punteada). (Traducido y modificado por Sebastián Rivadeneira, del esquema que ha sido tomado del artículo de “Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs” de Crombé F.^{101–103})



***Realizado por Sebastián Rivadeneira**

Flujograma 2. Representación esquemática de las posibles rutas de transmisión de MRSA (línea continua) y estrategias de intervención teórica (línea punteada). (Traducido y modificado por Sebastián Rivadeneira, del esquema que ha sido tomado del artículo de “Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Pigs” de Crombé F.^{101–103})

2.12. Justificación

A inicios del siglo pasado, al poco tiempo del descubrimiento de los antibióticos se reportó, en investigaciones alrededor del mundo, el surgimiento de resistencia progresiva a antibióticos. En la actualidad, se confirma que su uso masivo y en muchos aislamientos mal utilizado en infecciones humanas (prescripción de antibióticos para tratamiento de infecciones virales), junto con el uso desproporcionado en la industria animal como promotores de crecimiento han colaborado enormemente en que esta resistencia bacteriana se convierta en un problema de salud pública y una amenaza permanente a nivel local y global.^{102,103}

Los productos veterinarios que se comercializan en el país, principalmente, por medio de un gran número de almacenes o farmacias veterinarias, especialmente, las ubicadas en las zonas rurales, son los causantes de un uso desmedido de antibióticos. Las personas que atienden estos locales no siempre tienen el suficiente acervo científico. Como es bien sabido, todos los antibióticos deben ser administrados siguiendo pautas previamente establecidas en cuanto dosis, frecuencia de administración y duración del tratamiento. Debido a que en la mayoría de locales no se cuenta con el personal adecuado, la prescripción de los antibióticos se la hace totalmente empírica, es muy raro que se apliquen las pautas que señala anteriormente.¹⁵

La historia de la resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus* es muy bien conocida. En los años 40, se identificaron cepas de *S. aureus* resistentes a las Penicilinas G y V, tan solo a pocos años de su introducción para el tratamiento de infecciones humanas. Por los años 60s, la industria farmacéutica supero este

problema con una penicilina semisintética del grupo de las oxacilinas (metecilina). Sin embargo, al poco tiempo cepas resistentes a este compuesto aparecieron dando lugar a pocas alternativas de tratamiento, una de ellas, la vancomicina.¹⁰

A inicios de este siglo se logran identificar cepas resistentes a la oxacilina en la comunidad. La resistencia hospitalaria era bien conocida para la época pero se desconocían los mecanismos de la resistencia comunitaria. Tomando como evidencia que la colonización de cepas resistentes inicia a nivel nasal en personas que no han tomado antibióticos directamente, como tampoco han estado expuestas al ambiente hospitalario, se logró determinar que el factor de riesgo más sustancial es el contacto con ganado. Encontrándose una mayor colonización de cepas resistentes en trabajadores que manipulan ganado porcino. Sin embargo, no se afirma que este tipo de animales sean los causantes de la resistencia asociada a la comunidad, es más se conoce que otros tipos de ganado y animales domésticos están vinculados con la posible transferencia.¹⁰⁰⁻¹⁰³

Mientras que un gran porcentaje de los antibióticos de uso humano se vende a través de la fórmula de un médico, esta figura es prácticamente ausente en el campo veterinario cuando se habla específicamente de ganadería. Cada vez hay más pruebas que sugieren que los animales de granja actúan como vectores o reservorios de MRSA e incluso pueden albergar cepas zoonóticas de MRSA.^{90,91,105}

Se ha demostrado que las personas con exposición ocupacional al ganado, tienen un mayor riesgo de colonización por MRSA y por lo tanto a infección *a posteriori*. A pesar de ello, se ha documentado que el MRSA está presente en cerdos sanos y es ahora más frecuente en muchos países incluyendo EE.UU. y Canadá.^{41,88} Existe un

considerable riesgo ocupacional de colonización nasal. Los estudios realizados en las comunidades en las zonas rurales y productoras de ganado porcino de Alemania y Holanda encontraron que el riesgo de la exposición parece estar limitado a las personas que tienen contacto directo con cerdos (ganaderos).^{103,106}

Los datos de exposición indican que el riesgo de colonización puede evolucionar en una infección clínica. Actualmente en el Ecuador no se poseen estadísticas, con respecto a la colonización en porcicultores, es por eso que son necesarios más estudios para comprender mejor la dinámica temporal de la exposición para determinar su riesgo.

2.13. Problema

¿Cuál es la prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en poblaciones que están al contacto continuo con ganado porcino? ¿En qué frecuencia las cepas de *Staphylococcus aureus* son resistentes a meticilina? ¿Cuál es la prevalencia de la toxina PVL los aislamientos de *S. aureus*?

2.14. Objetivo principal

Establecer la prevalencia de portadores nasales de MRSA en las comunidades de producción porcícola, identificados mediante pruebas fenotípicas y genotípicas en trabajadores vinculados al cuidado continuo de este tipo de ganado.

2.15. **Objetivos específicos**

- Identificar portadores de *MRSA* en trabajadores de cuidado porcino mediante cultivos sólidos de Manitol-Salado y CHROMagar MRSA® comparando su utilidad con el Vitek2® en muestras obtenidas de hisopados nasales.
- Analizar la presencia de los genes *nuc*, *mecA* y *lukS* y *F* codificantes de PVL en los aislados registrados como MRSA.
- Determinar la sensibilidad y especificidad a través de la comparación entre los distintos métodos de diagnóstico para detección de la resistencia de meticilina en *S. aureus*.

2.16. **Hipótesis**

Por lo descrito con relación al MRSA, se ha señalado la posibilidad de colonización nasal en cierto tipo de poblaciones sin exposición al ambiente hospitalario o exposición a antibióticos recientemente, se ha señalado que los trabajadores de sitios de producción de ganado porcino, están expuestos a un riesgo inminente de contagio con MRSA. Se pretende mediante la comprobación fenotípica y genotípica de los aislados positivos, corroborar la misma tendencia de una relación de que por cada 100 trabajadores en granjas porcícolas, 9 presentarán colonización nasal por MRSA.¹⁰⁰⁻¹⁰³ Enfocándose en la metilcilino resistencia, adquirida en la comunidad, esta debe cumplir los parámetros descritos de correlación genética, en mismo número con la presencia de genes *mecA* y genes *Luk* codificantes de la toxina Panton-Valentine.

3. CAPÍTULO: METODOLOGÍA

« Me enseñaron que el camino del progreso, no es ni rápido ni fácil.

Nada en la vida es de temer, todo es para ser entendido».

Marie Salomea Skłodowska-Curie,

Premio Nobel de Física (1903) y Química (1911).

3.1. Tipo de Estudio

Para determinar la colonización nasal de MRSA en cuidadores de ganado porcino se planteó un estudio **Transversal** que precisa una única toma de muestra, en una sola intervención con los individuos, de **Prevalencia**, para determinar la frecuencia de los portadores nasales de MRSA y **Experimental**, debido a que las muestras obtenidas en este caso mediante hisopados nasales, se procesaron en laboratorio, para comprobar la existencia microbiológica de la bacteria, tanto por medios fenotípicos y genotípicos.

3.2. Población

3.2.1. Identificación de la población.

En 2012 se realizó un convenio en una cooperación realizada entre el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), la Agencia Ecuatoriana para el Aseguramiento de la Calidad (AGROCALIDAD) y la Asociación de Porcicultores del Ecuador (ASPE) para ejecutar el primer censo de granjas porcícolas, su propósito fue capturar la mayor información necesaria para construir una línea base de la industria y producción de la producción de ganado porcino.¹⁰⁷

En el informe del censo se evidenció las provincias que aportan con más población porcina del país, son en orden de importancia: **(Figura 11)** Manabí (12,4%), Pichincha (12,4%), Chimborazo (9,4%), Loja (9%), Azuay (8,5%), Guayas (8,2%), Cotopaxi (6,8%), Tungurahua (5,9%), y Bolívar (5,5%). Es así que en Pichincha tiene una de las poblaciones de ganado porcino más grandes del país y es una población adecuada para obtener la muestra. ¹⁰⁷ **(Figura 12)**

Primeramente se estudiaron los sectores productores porcícolas de Pichincha, determinando que las zonas más dinámicas de producción de ganado porcino están en Mejía, Rumiñahui y Quito. ^{108,109}

3.3. Trabajo de Campo

El pilar clave fue el hisopado de narinas anteriores y una adecuada técnica era fundamental, para poder recolectar la mayor cantidad de microorganismos. ^{110,111}

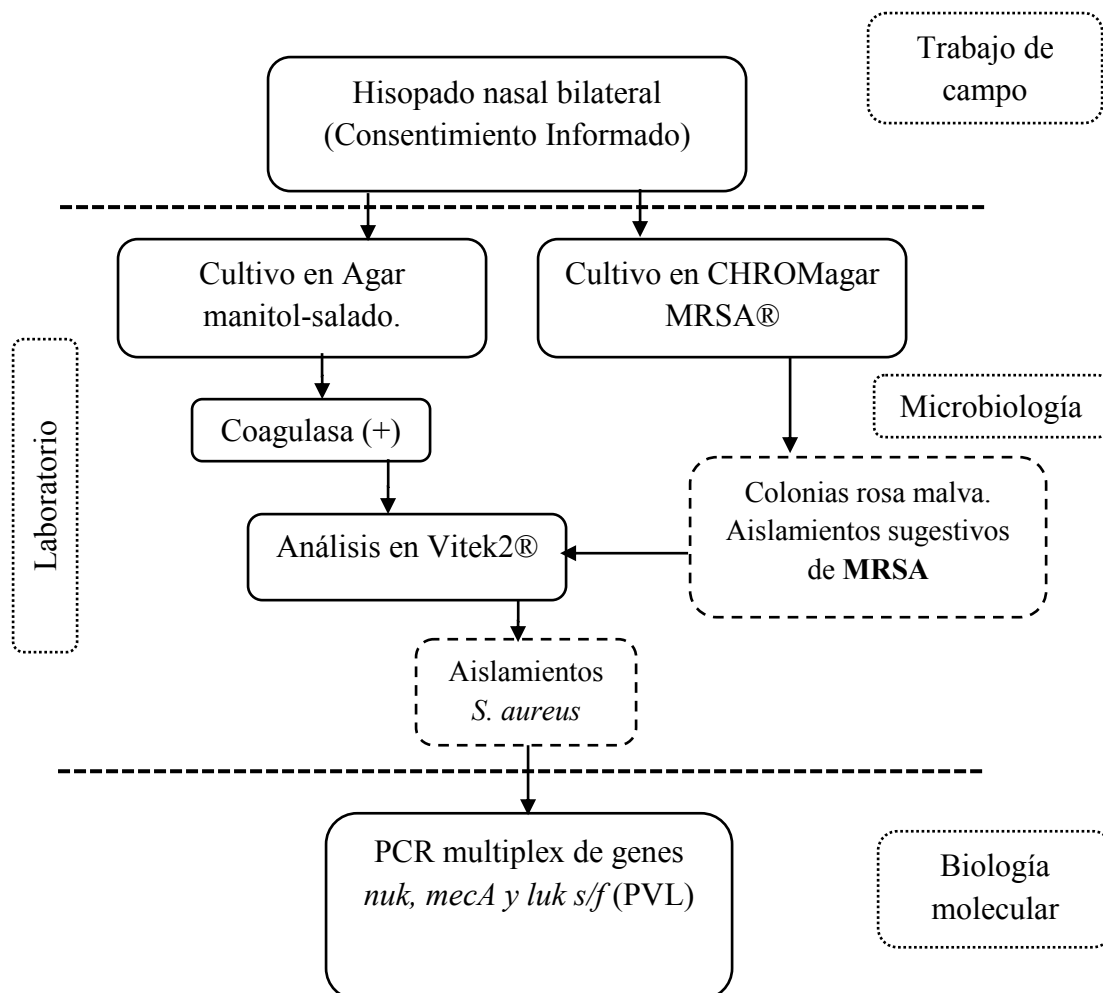
Por lo que se siguieron estos pasos:

1. Lavarse las manos previamente.
2. Se abre retirando la bolsa estéril que contiene el hisopo, en el punto indicado por la diagrama en la parte exterior del paquete.
3. Posterior se gira para quitar el tapón del tubo del medio de transporte.
4. Retirar el hisopo.
5. Colocar el hisopo aproximadamente 2,5 cm (aproximadamente $\frac{3}{4}$ de pulgada) en la fosa nasal, en sentido vertical, se abarcó la zona vestibular nasal anterior. **(Figura 10)**
6. Girar el hisopo contra la mucosa nasal anterior por lo menos 5 veces durante 10 segundos.

7. Utilizando el mismo hisopo se realiza el mismo procedimiento por la otra fosa nasal.
8. Colocar el hisopo de nuevo en el medio de transporte Stuart.
9. Se empuja el extremo del hisopo firmemente para asegurarse de que el hisopo se inserta en el medio. Se debe asegurar de que la punta del hisopo está en contacto con el medio humedecido.
10. Se fija la tapa del tubo de transporte
11. Al concluir el procedimiento se etiqueta el hisopo en la etiqueta pre impresa con los datos del participante
12. Se debe retirar y desechar los guantes.

El hisopado se realizará exclusivamente a los trabajadores en contacto continuo con ganado porcino con previa instrucción y documentación del estudio, certificando su participación con la firma del consentimiento informado.^{110,111}

Posterior a la recolección, la muestra se mantendrá en medios de transporte Stuart y se deriva inmediatamente a los análisis en los Laboratorios *Zurita & Zurita*, ubicados en Quito, para poder cultivar y aislar las bacterias del hisopado. (*Ver Flujograma 3*)



***Realizado por Sebastián Rivadeneira**

Flujograma 3. Metodología para identificación de MRSA utilizada en el presente estudio.

3.4. Variables.

En el siguiente cuadro se detalla las variables clasificadas por:

- Factores sociodemográficos, de exposición, características fenotípicas y genotípicas.

3.5. Criterios de inclusión y exclusión.

Las variables descritas previamente aseguran el orden y seguimiento de las muestras recolectadas, así como también nos servirán para categorizar si la muestra obtenida es adecuada para el estudio, por lo que se debe filtrar con los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Personas involucradas en la actividad porcícola que estén en cuidado y contacto continuo.
- Mayores de 18 años de edad.
- Personas sin importar sexo que hayan entendido el objetivo del estudio y estén de acuerdo con firmar el consentimiento informado.
- Personas que permitan realizarse el hisopado nasal anterior, en ambas fosas y transportado en medio Stuart.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- El uso de antibióticos reciente. Menor de 3 meses a la fecha de la toma.
- Hospitalización o intervención en algún nivel de salud dentro de los 2 últimos años.

3.6. Cálculo de la muestra

Para el cálculo de la muestra se identificó 13 estudios recientes alrededor del mundo con similar metodología y objetivos al presente estudio, identificando la prevalencia en los individuos portadores de MRSA nasal, vinculados al trabajo con ganado porcino.

Categorización de las variables

Variables	Definición Conceptual	Dimensiones	Indicador Definición Operacional	Unidad de Medida o Categorización
FACTORES SOCIODEMOGRÁFICOS	Características sociales y geográficas que permiten definir una población.	Sexo	Características fenotípicas Sexuales.	1. Masculino. 2. Femenino.
		Edad	Años cumplidos a la fecha	Grupos etarios definidos por la OMS. 1. Menores de 24 años: Joven 2. 25 - 35 años: Adulto joven 3. 36 - 45 años: Adultez temprana 4. 46 – 60 años: Adultez media 5. Mayores de 60 años: Adulto mayor
		Localidad	Parroquia donde está ubicado el sitio de producción.	1. Aloag 2. Checa 3. Cotogchoa 4. Guamaní 5. Machachi 6. Pintag 7. Sangolquí 8. Tambillo 9. Tumbaco 10. Yaruquí
		Ocupación en relación ganado porcino	Tipo de actividad	1. Cuidador en contacto continuo con ganado porcino.

FACTORES DE EXPOSICIÓN	Determinar la fuerza de la exposición y cuantificar la labor con el ganado porcino. Descartar factores extrínsecos de meticilino-resistencia hospitalaria.	Años de trabajo.	Años que ha dedicado continuamente al ganado porcino		Años agrupados por tendencia: 1. Menores de 15 años dedicados. Corta práctica. 2. Mayores de 15 años dedicados. Larga práctica.
		Horas al día al promedio dedica actividad porcícola.	Horas diarias		Horas al día agrupadas por la Jornada. 1. Media jornada: Menor de 4 horas. 2. Jornada completa: Mayor de 4 horas.
		Exposición en Hospitales	Alguna vez ha sido hospitalizado.		1. Si - CRITERIO DE EXCLUSIÓN 2. No - CRITERIO DE INCLUSIÓN.
		Uso reciente de antibióticos	Uso de antibióticos reciente, últimos 2 meses.		1. Si - CRITERIO DE EXCLUSIÓN 2. No - CRITERIO DE INCLUSIÓN.
FACTORES DETERMINANTES DE LA MUESTRA	Establece las características de la muestra tomada por hisopado nasal frente a los análisis fenotípicos como primer filtro.	Fosas nasales	Cuantas		Ambas - CRITERIO DE INCLUSIÓN
		Medio de transporte	Tipo de transporte		Stuart - CRITERIO DE INCLUSIÓN
		Aislamiento bacteriano. Por cultivo y por prueba bioquímica.	Crecimiento bacteriano.	Sugestivo de colonias doradas.	1. Positivo 2. Negativo
			Agar manitol salado.		
			Coagulasa		1. Positiva 2. Negativa

CARACTERÍSTICAS E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA
SUGESTIVA DE *S. aureus*

Identificación fenotípica y genética, de bacterias que son sugestivas de <i>S. aureus</i> .	Determinación de especie y perfil de resistencia.	Crecimiento bacteriano específico.	CHROMagar MRSA®: Colonias Rosa Malva. Sugere de MRSA.	1. Positivo 2. Negativo.
		IDENTIFICACIÓN		
		Vitek2®		1. <i>Staphylococcus aureus</i> 2. <i>Staphylococcus lugdunensis</i> 3. <i>Staphylococcus sciuri</i> 4. <i>Staphylococcus vitulinus</i> 5. <i>Staphylococcus warneri</i> 6. <i>Staphylococcus lentus</i> 7. <i>Staphylococcus caprae</i> 8. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 9. <i>Kocuria rosacea</i> 10. <i>Staphylococcus coagulasa</i> positivos, no identificados.
			Perfiles De Resistencia: Penicilina, Eritromicina, Tetraciclina, Trimetropín-Sulfametoxazol, Clindamicina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina, Presencia de Metilasa, Oxacilina disco FOX, Vancomicina, Linezolid, Rifampicina.	Para cada antibiótico se configura los cohortes correctos en milímetros ajustado a los rangos de: 1. Resistente 2. Intermedio 3. Sensible
		Comprobación genética en <i>S.</i> <i>aureus</i> confirmados por Vitek2®.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Nuc</i> • <i>MecA</i> • <i>Luk s/f</i> <i>codifican</i> <i>PVL</i>. 	1. Positivo. 2. Negativo.

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

Objetivo del Estudio	Año	Prevalencia humanos colonizados a nivel Nasal (%)	Muestra	Lugar	Autor
Identificar Prevalencia de MRSA Portadores Nasales - Trabajadores con Cerdos (Pig farmers)	2009	0	148	Suiza	Huber <i>et al.</i>
	2004	2	29	Singapur	Sergio <i>et al.</i>
	2009	2	101	Irlanda	Horgan <i>et al.</i>
	2009	5.5	90	Malaysia	Neela <i>et al.</i>
	2010	9	60	Holanda	Kock <i>et al.</i>
	2007	9	11	Italia	Pan <i>et al.</i>
	2010	9	54	España	Morcillo <i>et al.</i>
	2008	15	13	China	Cui <i>et al.</i>
	2007	20	25	Canadá	Khanna <i>et al.</i>
	2010	22	9	USA	Osadebe <i>et al.</i>
	2004	23	26	Holanda	Voss <i>et al.</i>
	2007	23	86	Alemania	Meemken <i>et al.</i>
	2008	45	20	Iowa	Smith <i>et al.</i>
Mediana		9.00			
Moda		9.00			

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

El valor más adecuado para tomarlo como una proporción estimada es del **9%(0.09)**.

Aplicando la fórmula para muestreo en poblaciones infinitas¹¹²:

$$N = \frac{(Z\alpha)^2 (p)(q)}{\delta^2}$$

Dónde:

- $Z\alpha^2 = 1.96$ al cuadrado (si la seguridad es del 95%) $0 \ 1.96^2 = 3.8416$
- $p =$ proporción esperada $= 9\% = 0.09$
- $q = 1 - p = 0.91$
- $\delta =$ precisión $(5.5\%) = 0.055^2 = 0.003025$

$$N = 104$$

Requiriendo una muestra 104 personas contacto directo con ganado porcino en sitios de producción en la provincia de Pichincha. Con el fin de prevenir alguna falla ulterior en el proceso de análisis de la muestra, se recomienda incrementar el 10% a la muestra. Sumando así, 114 personas. La muestras total recolectadas, fue en un total de **115** hisopados.

3.7. Procedimientos de recolección de información:

El consentimiento informado ha sido firmado por los participantes en el estudio, previo a la realización del hisopado nasal y legitimando el permiso de obtención de datos como los de filiación y actividad diaria. Fueron informados sobre el título, objetivos, riesgos y beneficios del procedimiento y de la presente investigación.

3.8. Análisis de datos

3.8.1. Recolección de datos - Fase pre analítica

Posterior a la firma del consentimiento informado, cada participante completó las variables solicitadas en el estudio, mismas que son tabuladas en una matriz de Excel. Se les asignó un código, el mismo que es útil para guardar la confidencialidad de las personas, el mismo que fue ingresado en los procesos automatizados en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Biomedicina de *Zurita & Zurita*. Se registró la fecha y hora de toma, junto con la procedencia de la muestra.

3.8.2. Fase Analítica – Laboratorio

Una vez que el hisopo, llegó al centro de Investigaciones en el medio de transporte Stuart, se procedió a la incubación en los medios sólidos manitol-salado y para preservar las muestras, se aíslan en medios de enriquecimiento de tioglicolato,

mismos que son guardados a temperaturas de 37°C. Posterior a las 24 y 48 horas, se leen los crecimientos en los agares y se procedió a dar pases en aquellas colonias doradas-amarillas, sospechosas de *S. aureus*; para la prueba coagulasa, se estima 24 horas más para la lectura de la formación de coágulo en plasma de conejo que es el componente que precipita esta enzima. Una vez categorizadas las muestras en el primer filtro, se ingresaron al sistema automatizado del Vitek2® para la lectura de género y especie con el panel de resistencias antibióticas. En aquellas cepas, con resistencia a la oxacilina (metecilina) se procede a la inoculación en medio sólido de CHROMagar MRSA®, para proceder con la lectura de 24 a 48 horas. Las colonias sugestivas de MRSA en este agar, se teñirán de color rosa malva.

Paralelamente al identificar el perfil de resistencia a la metecilina, se procesó en el área de biología molecular con Reacción en Cadena de la Polimerasa, donde se amplificaron 3 genes. El específico de la especie, *nuc*. El específico de resistencia a la metecilina, *mecA*., y los genes *lukS* y *lukF*, que se unen y codifican a la toxina PVL.

Todos estos datos son tabulados en la matriz de Excel.

3.8.3. Recopilación de Resultados – Fase Post analítica

Una vez completa la matriz de Excel, se corroboraron los datos de los códigos con los de los pacientes y sus resultados, se comprobó el número de muestras procesadas. Tras este filtro de seguridad los datos son extrapolados a una matriz del software de **IBM-SPSS® 20^{ma} edición**. Tras el ingreso a la nueva matriz, se deriva a analizar los datos estadísticamente:

- Para el estudio descriptivo de prevalencia se corrieron frecuencias en cada variable. Las mismas que nos sirvieron para el contaje.

- Se purificó la base de datos, tras eliminar participantes de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión.
- Se comprobó por frecuencias los distintos tipos de bacterias encontradas.
- Posterior se creó una base de datos secundaria pura de los aislamientos de *S. aureus* en cuidadores de ganado porcino. La misma que nos sirve para, evaluar los diferentes métodos de diagnóstico utilizados tanto los fenotípicos y genotípicos en base a los resultados que emite el sistema automatizado del Vitek2®. Usando las medidas de evaluación como la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos junto con la Razón de Verosimilitud (**Likelihood Ratio: LR**)
- En la población general de cuidadores de ganado porcino, se plantearon tablas de contingencia para determinar riesgo relativo utilizando las variables de exposición:
 - Carga horaria promedio dedicada al día a esta labor: Agrupadas como medio jornada de 4 horas y completa de 8 horas.
 - Años Laborales que han venido trabajando en la tarea porcícola: Separadas por una cohorte de menos de 15 años como corta trayectoria y mayor a 15 años como larga trayectoria.
- Adicionalmente, se estudiaron los perfiles de antibióticos de las cepas de *S. aureus* para identificar los diversos patrones de resistencia y sensibilidad.

3.9. Aspectos Bioéticos

Es necesario señalar que este trabajo, no es un estudio de intervención o que expone al participante a un proceso invasivo, para esto se ha diseñado un consentimiento informado, que cumple las normas y parámetros bioéticos, estipulados en la 64^a Asamblea General, realizada en Fortaleza, Brasil, en octubre 2013 en conmemoración de la Declaración de Helsinki. Adicionalmente fue adecuado a las normas del Ministerio de Salud Pública del Ecuador, de la libre participación en procesos de investigación sin fines de lucro, y que fue analizado y aprobado finalmente por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, con este último aval, se garantiza que el estudio está dentro de los lineamientos éticos que demandan el anonimato, privacidad, autonomía, voluntad y confidencialidad de los pacientes en tanto a sus derechos.

Cabe recalcar, este estudio, declara no tener **Conflictos de Interés**.

3.10. Aspectos administrativos

Esta tesis fue posible gracias a los fondos de investigación del Proyecto No MIC-004 de la Unidad de Investigaciones en Biomedicina de *Zurita & Zurita* Laboratorios. Los fondos se utilizaron en materiales para PCR, Vitek2®, e identificación de los *Staphylococcus*

4. CAPÍTULO: RESULTADOS

« Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará inteligente; y aunque sea débil, se convertirá en fuerte».

Leonardo Da Vinci

Polímota del Renacimiento, Italia.

4.2. Frecuencia Bacteriana aislada en las muestras nasales.

Se trabajaron 115 hisopados nasales, (**Figura 13**). *S. aureus* con una prevalencia del 65.08%, en un segundo lugar *S. lugdunensis* en un 9.52%, seguido de *S. sciuri* con una frecuencia de 6.35%, en cuarto puesto *S. vitulinus*, con un 4.76%, en quinto lugar *S. lentus* con un 3.17%, y en último lugar con un empate en las frecuencias de *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *Kocuria rosacea* con 1.59% en cada especie.

4.3. Distribución de bacterias identificadas según su ubicación geográfica

Tras la identificación de las diferentes bacterias por Vitek2®, se encontró que de los 73 cultivos que evidenciaron crecimientos bacterianos, 35 son *S. aureus*, de los cuales 12/35 (34.28%), están ubicados en Sangolquí presentando la prevalencia más alta de esta bacteria a nivel nasal en los cuidadores de esta zona. Incluso esta zona maneja la mayor frecuencia de *S. lugdunensis*, 3 aislamientos (50%) sobre los 6 en total encontrados, comparando con los demás lugares entre esta especie. (**Tabla 1**)

En segundo lugar Pintag ha presentado 9/35 (25.71%) portadores nasales de *S. aureus*, seguido de Tumbaco con un 8/73 (22.85%). Tambillo 4/35 (11.42%). Guamaní con 3/35 (8.57%) cepas de *S. aureus*.

4.4. Frecuencias de meticilino resistencia y sensibilidad en las cepas aisladas de *S. aureus*, según distribución geográfica

Obteniendo los análisis del Vitek2® para determinar la sensibilidad y resistencia de las cepas aisladas en los distintos sitios de producción de ganado porcino de las parroquias de Pichincha, se evidencia que Guamaní desplegó 3/7 (42.85%) de aislados MRSA que fueron 7 (**Tabla 3**). Seguido de sitios como Yaruquí, Pintag, Sangolquí y Tumbaco con 1 caso (14.28%) de MRSA, por cada ubicación. También, se puede destacar los lugares con más frecuencia de *S. aureus* sensibles a la meticilina, está en primer puesto Pintag con un 8/28 (28.57%), Sangolquí 7/28 (25%), Tumbaco 6/28 (21.42%) y Tambillo con el 4/28 (14.28%) de MSSA comparada con el subgrupo de *S. aureus* sensibles a la meticilina.

4.5. Crecimiento fenotípico de meticilino resistencia en las cepas de *S. aureus*

Posterior a la identificación por pruebas bioquímicas se inocula *S. aureus* sospechosos, para comprobar resistencia a la meticilina, en un agar específico que exhibirá colonias color **rosa malva** sugerente de MRSA para esta prueba de los 35 aislados, el 22.85% presentaron este tipo de colonias sugerentes de meticilino resistencia, mientras el 77.15% carecía de crecimiento en este tipo de agar sólido

conocido como CHROMagar MRSA®, catalogándolos fenotípicamente como MSSA. (*Figura 14*)

4.6. Prevalencia de MRSA en cuidadores de ganado porcino, Pichincha.

Se obtuvo una muestra de 115 cuidadores en contacto continuo de ganado porcino que cumplen con los criterios de inclusión, aseverando de esta manera, que no han estado expuestos a ningún factor nosocomial, posterior a la construcción de una base de datos en el programa IBM-SPSS® 20^{ma} edición. Se corren las frecuencias de meticilino resistencia y sensibilidad de *S. aureus* aislados, por medio del sistema automatizado del Vitek2®. (*Figura 15*)

En esta muestra se evidencia una prevalencia de 6.08% de *S. aureus* meticilino resistentes (7/115).

4.7. Perfiles de resistencia de los *S. aureus* aislados a nivel nasal.

Tras agrupar *S. aureus* aislados en la muestra obtenida, se obtienen 35 cepas de los 115 individuos, tras introducir al sistema automatizado del Vitek2®, que reporta los perfiles de sensibilidad y resistencia a diversos antibióticos, se obtiene las siguientes frecuencias: (*Figura 16*)

4.7.1. Cefoxitina (reporte de oxacilina)

Se evidencia 7 (20%) aislamientos de los 35 *S. aureus*, que presentan meticilina (oxacilina) resistencia (MRSA) por Vitek2®, en comparación a los 28/35 *S. aureus* (80%) sensibles a la meticilina (MSSA) entre todas las cepas encontradas de esta especie.

4.7.2. Penicilina

La resistencia a este medicamento es marcada en *S. aureus*, ya que bordea el 91.4% (32/35) de todas las cepas aisladas, opuesta a una sensibilidad disminuida de un 8.6% (3/35) a este β -láctmico, de todas las cepas de esta especie.

4.7.3. Gentamicina

Los aislamientos de *S. aureus* identificadas, muestran una resistencia de un 11.4%(4/35) ante una sensibilidad acogedora de 88.6% (31/35) frente a este aminoglucósido.

4.7.4. Quinolonas

El comportamiento para este grupo de antibióticos, los perfiles de resistencia de *S. aureus*, aislados demuestran que frente a la ciprofloxacina prueban una resistencia entre todas las cepas de un 8.6% (3/35) y una sensibilidad de un 14.3%(5/35). Sin embargo, según los discos de concentración mínima inhibitoria que maneja el Vitek2®, se acredita que existe una sensibilidad intermedia del 77.1% (27/35) para esta quinolona de tercera generación. También, existió un empate en la resistencia frente a levofloxacino y moxifloxacino, del 8.6% (3/35) y una sensibilidad del 91.4%(32/35) en ambos fármacos.

4.7.5. Metilasa

Metilasa constitutiva o inducible, tiene como función introducir un grupo metilo en en el ARN ribosómico. Esta modificación va a conferir resistencia cruzada entre macrólidos y lincosamidas.¹¹² La presencia de metilasa en este grupo de *S. aureus*,

de un 28.6%(10/35) y ausencia de esta enzima en los aislados es de un 71.4%(25/35).

4.7.6. Eritromicina

Es interesante que las cepas que pasaron por el Sistema automatizado del Vitek2® hayan reportado una resistencia frente a este macrólido de un 37.1%(13/35) y con una sensibilidad de un 62.9%(22/35).

4.7.7. Clindamicina

Se demostró que existe una resistencia de un 31.4%(11/35) a esta lincosamida pero con una buena respuesta de 68.6%(24/35) de sensibilidad.

4.7.8. Vancomicina

La respuesta a este glicopéptido fue eficaz de todas las cepas aisladas, ya que presentó un 100% de respuesta sensible, según los parámetros que maneja el Vitek2®.

4.7.9. Tetraciclina

El comportamiento de este grupo de *S. aureus*, presentó una resistencia de 25.7%(9/35) y una sensibilidad del 74.3%(26/35).

4.7.10. Trimetoprima-Sulfametoxazol

Este fármaco compuesto de un bacteriostático como el trimetoprima junto a una sulfonamida, tiene un perfil de resistencia de un 5.7%(2/35 y un 94.3%(33/35) de sensibilidad.

4.7.11. Rifampicina y Linezolid

La sensibilidad en todos los aislados demostró en ambos antibióticos una cobertura del 100%.

4.8. Distribución del perfil de resistencia y sensibilidad a la meticilina de *S. aureus* aislados, acorde al grupo etario y sexo.

De la muestra obtenida de 115 participantes, se manifestó que 35 (30.43%) participantes presentan a nivel nasal *S. aureus*, en primer plano se plantea un análisis cruzado multivarial, que consta con la primera variable que es la sensibilidad y la resistencia a la meticilina, y en segundo plano se subordina los subgrupos conforme el sexo y de edad; está última catalogada según los criterios de la OMS. (**Figura 17**)

Visualizando de esta manera:

- Primer grupo *S. aureus* meticilino sensibles (MSSA):
 - En el sexo masculino, el grupo etario portador nasal, con mayor porcentaje es el adulto joven (25-35 años), abarcando el 50% en este subgrupo, seguido del hombres que se encuentran en la adultez temprana (35-45 años), con un 30%.
 - En las mujeres, la distribución presenta una propensión más homogénea, en grupos etarios como la adultez media (46-60 años) y mayor (sobre los 60 años), comparten el 29.41%. Paralelamente, englobando más de la mitad de la totalidad en este

género en este subgrupo, seguido de la adultez temprana y media, con el 23.52% y 17.64% respectivamente.

- Segundo grupo ***S. aureus* meticilino resistentes (MRSA)**:
 - Los hombres mantienen única distribución, encontrada en este estudio, siendo 2 notables aislamientos de portadores MRSA, en personas que cursan la adultez media. (***Figura 17***)
 - En el sexo femenino, la repartición de aislamientos se mantiene como primer grupo a la adultez media con el 40% de los aislamientos de MRSA, seguido con una paridad en la distribución en mujeres jóvenes junto a las que cursan la adultez joven y temprana, con un 20% cada grupo, que presentan MRSA a nivel nasal.

4.9. Distribución de la presencia de genes *nuc*, *mecA* y *Luk s/F* codifican PVL, en *S. aureus* aislados, ordenados de acuerdo a su patrón de meticilino sensibilidad y resistencia.

Uno de los objetivos principales del estudio es el de identificar la presencia genética de *nuc*, *mecA* y *Luk s/F* codifican PVL, en *S. aureus* identificados, por lo que mediante PCR Multiplex, se encontraron: (***Figura 18***)

- Primer grupo ***S. aureus* meticilino sensibles (MSSA)**:
 - Se encontraron 28 MSSA (80%), con los siguientes modelos genéticos.

- 27 cepas (96.42%) presentaron el gen *nuc*, y un caso (3.57%) que carecía el mismo.
 - 26 aislados (92.85%) no presentaron gen *mecA*, acorde con la teoría que lo describe como el gen de la meticilino resistencia, sin embargo 2 aislamientos (7.14%) fueron positivos.
 - 22 cepas (82,14%) de MSSA encontrados, no presentaron los genes que codifican a PVL pero 5 aislamientos (17.85%) fueron positivos.
- Segundo grupo ***S. aureus* meticilino resistentes (MRSA)**:
 - Entre los 7 aislamientos de MRSA manifestos:
 - En su totalidad todos presentaron el gen *nuc*.
 - 5 aislados (71.42%) fueron positivos para el gen *mecA*, no obstante, contradictoriamente 2 aislamientos (28.58%) no presentaron este gen. (**Figura 18**)
 - De todos solo un caso exhibió los genes que codifican a PVL. El 85.71% restante mostraron ausencia de *Luk s/f*.
 - Presencia de genes *luk s/f* fue de 6 de 35 *S. aureus* aislados (17.14%). Que representa en el total de la muestra calculada (n=115) el 5.21% de prevalencia de estos genes que codifican la toxina PVL.

4.10. Factores de exposición en los cuidadores de ganado porcino.

4.10.1. Carga promedio de horas al día que emplean a la porcicultura.

El contingente de individuos por estudiar son los 35 aislamientos portadores de *S. aureus* a nivel nasal, en los que se ha dividido, por el factor de exposición que es la carga en tiempo (horas el día) que está sometido el trabajador con el ganado porcino y el patrón de meticilino resistencia. (**Figura 19**).

Frente a esto se delimita la variable de carga horaria, en media jornada (menor de 4 horas) y la jornada completa (mayor a las 4 horas), para así definir el peso de esta variable se plantea el cálculo de riesgo relativo (RR) en una tabla 2x2. (**Ver Tabla**)

Interpretando el riesgo relativo estadísticamente:

- 1) Cuando tiene un valor igual a 1 figura que aquellos sujetos expuestos al factor en estudio tienen un menor riesgo, mientras que un valor mayor a 1, expresa la exposición otorgando mayor riesgo. Un valor igual a 1 significa que el riesgo es el mismo en ambos grupos, siendo nula la variable y la exposición.

Cálculo:

El riesgo relativo (RR) sería = $a/(a+b) / c/(c+d) = 0.33/0.13 = 2.53$ (**I.C.95%**)

Este valor define la magnitud o fuerza de la asociación, reconociendo la comparación de la frecuencia con que ocurre el evento entre los que tienen el factor de riesgo y los que no lo tienen. En este caso es de 2.53, es mayor a 1, puntualiza

que existe un riesgo entre la variable temporal (horas al día) proporcional y la adquisición de meticilino resistencia. (*Tabla 4*)

4.10.2. Años dedicados a la porcicultura

Acogiendo el mismo contingente de 35 individuos que presentaron colonización por *S. aureus* a nivel nasal, se agrupó en cohortes de 15 años, se formaron 3 grupos que no son compatibles para el análisis del riesgo relativo (Tablas 2x2). (*Figura 20*). Por lo que se divide por tendencia, en los aislamientos que hayan laborado menos de 15 años como corta trayectoria y a los mayores de 15 años como larga. (*Ver Tabla 5*) se construyó una tabla de 2x2 para el estudio:

Cálculo:

El riesgo relativo $RR = a/(a+b) / c/(c+d) = 0.41/0.08 = 4.79$ (I.C.95%)

Reiteradamente se asegura que la magnitud o fuerza de asociación, para que la frecuencia en que ocurre la meticilino resistencia entre los que tienen el factor, es de 4.79, comprobándose, un riesgo entre la variable temporal de años proporcional para la adquisición de meticilino resistencia. (*Tabla 5*)

4.11. Índices estadísticos de valoración necesarios para la evaluación de una prueba diagnóstica.

Para este apartado se utilizarán índices de confiabilidad clínica, como son:

1) Sensibilidad

- Es el índice que tiene la función de desplegar una proporción de resultados positivos en individuos con una determinada enfermedad. Por ello, mide la tasa de individuos enfermos correctamente diagnosticados, revelando *la capacidad de una prueba para detectar a un sujeto verdaderamente enfermo*. Por lo tanto, una alta sensibilidad demuestra, un bajo número de falsos negativos.¹¹³⁻¹¹⁵

2) Especificidad

- Es el índice que expresa el porcentaje de resultados negativos en pacientes que no padecen esa enfermedad (“casos sanos”). La especificidad mide la destreza de una prueba para detectar correctamente individuos sanos, *determinando la probabilidad de que un individuo sano tenga un resultado negativo*. Una alta especificidad indica una baja frecuencia de falsos positivos.¹¹³⁻¹¹⁵

3) Valor predictivo positivo

- El valor predictivo positivo de una prueba, basada en la *probabilidad de que una prueba positiva correspondiese a un verdadero enfermo* o el porcentaje de pacientes enfermos con verdaderos resultados positivos con respecto al total de casos correspondientes.¹¹³⁻¹¹⁵

4) Valor predictivo negativo

- El valor predictivo negativo de una prueba *será la probabilidad de que una prueba negativa determinase cabalmente a un individuo*

efectivamente sano o el porcentaje de individuos sanos con verdaderos resultados negativos con relación total de casos correspondientes. ¹¹³⁻¹¹⁵

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b+d}$$

$$\text{VPP} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{VPP} = \frac{d}{c+d}$$

$$\text{RPP} = \frac{\text{Sensibilidad}}{1-\text{Especificidad}}$$

$$\text{RPN} = \frac{1-\text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

***Realizado por Sebastián Rivadeneira**

5) Razones de Verosimilitud (Cociente de Potencia /Eficiencia Pronóstica)

- Son índices de valoración clínicamente útiles y *no obedecen a la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada.* ¹¹³⁻¹¹⁵
- Estos miden *cuán potente es la prueba para determinar un resultado concreto (positivo o negativo)* según la presencia o ausencia de enfermedad. ¹¹³⁻¹¹⁵
- La ventaja de los cociente frente a los valores predictivos positivo y negativo de la prueba radica en que éstos no dependen de la proporción de enfermos en la muestra; sino tan sólo de la

sensibilidad y especificidad de ésta, de ahí su *utilidad clínica a la hora de comparar pruebas diagnósticas con una de referencia*.¹¹³⁻¹¹⁵

1) Cociente de probabilidad positivo o de verosimilitud / likelihood ratio of positive test (LR +)

- Este indica mejor capacidad para diagnosticar la presencia de enfermedad. *A mayor likelihood ratio positivo, mejor es el test para confirmar a un verdadero positivo.* ¹¹³⁻¹¹⁵

- $LR (+) = \text{tasa de verdaderos positivos} / \text{tasa falsos positivos}$

2) Cociente de probabilidad positivo o de verosimilitud / likelihood ratio of positive test (LR -)

- Es un índice de eficiencia pronóstica de una prueba al resultar negativa. Ésta es inversa a la anterior, entre menor es el valor aumenta la vigor diagnóstico. Interpretándose como *la probabilidad de que la enfermedad esté ausente dado un resultado negativo.*¹¹³⁻¹¹⁵

- $LR (-) = \text{tasa de falsos negativos} / \text{tasa de verdaderos negativos}$

INTERPRETACIÓN:

De acuerdo al valor existen intervalos de los puntajes, que representan la utilidad de la prueba en escalas¹¹⁶:

Interpretación de los Cocientes de verosimilitud (LR) con respecto al puntaje.

<i>Likelihood ratio positivos:</i>	<i>Likelihood ratio negativo:</i>
Pauta. Mayor puntaje proporcional la utilidad clínica.	Pauta. Utilidad de LR (-). Son el inverso de los LR (+)
> 10 = excelente test	< 0,1 = excelente test
6 a 10= buen test	0,16 a 0,1 = buen test
3 a 6 = regular test	0,33 a 0,16 = regular test
1 a 3= mal test	1 a 0,33 = mal test
1 = inútil	1 = inútil

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

4.11. Métodos de identificación fenotípicos

4.11.1. Coagulasa frente al Vitek2®

El contingente para el análisis de esta prueba son todos los individuos de la muestra (n=115), por haber sido sometidos con coagulasa en el estudio. (**Figura 21**)

La coagulasa como se describió es una enzima, que se considera de primera mano para la identificación entre *Staphylococcus aureus*, adicionalmente se ha estudiado

que existe una *libre* y otra que es *fija* a la cápside de la bacteria; tanto que su comportamiento temporal para la formación del coágulo. Existen varias que se disgregan fácilmente, generando lecturas de falsos negativos, debido a ello se plantea la valoración de esta prueba frente a la identificación del Vitek2® como **“Gold standard”**. Sin importar el tipo de coagulasa, se toman los resultados de la lectura hecha a las 24 horas, y su concordancia con el resultado generado por el sistema automatizado. (*Ver Tabla 6*)

Según los resultados, se edifica una tabla de 2x2 para la siguiente búsqueda aplicando las medidas de evaluación:

Resultados:

Sensibilidad 82.86%

Especificidad 81.25%

Valor predictivo positivo 66%

Valor predictivo negativo 92%

Likelihood ratio test + + 4.42 (Utilidad de nivel Regular)

Likelihood ratio test - - 0.21 (Utilidad de nivel Regular)

4.11.2. CHROMagar MRSA® frente al Vitek2®

El contingente para el análisis de esta prueba son todos los individuos que fueron inoculados en agar sólido específico, como es el CHROMagar MRSA®, un agar colorimétrico, que permite el crecimiento de colonias MRSA con pigmento **rosa**

malva categorizándolas como positivas. De la muestra (n=115) se sometieron a este paso aquellos que fenotípicamente cumplían con la sospecha de *S. aureus*, siendo un número de 35 muestras y a continuación se compara la efectividad de este agar para determinar la meticilino resistencia en *S. aureus*. (**Figura 22**) Según los datos del crecimiento en este agar *versus* los perfiles de resistencia a meticilina del sistema Vitek2®, se construye una tabla de 2x2 para la siguiente indagación, se aplican las medidas de evaluación previamente descritas. (**Ver Tabla 7**)

Resultados

Sensibilidad 85.71%

Especificidad 92.80%

Valor predictivo positivo 75.00%

Valor predictivo negativo 96.30%

Likelihood ratio test + + 12.00 **(Excelente Utilidad)**

Likelihood ratio test - - 0.15 **(Buen nivel de Utilidad)**

4.12. Evaluación de los métodos diagnósticos genotípicos

4.12.1. Gen *mecA* vs. Vitek2®

El contingente, para estudiar la potencia diagnóstica, del PCR Multiplex que determina entre ellos la presencia del gen *mecA*, se aplicó en una muestra, de todos los aislamientos de *S. aureus* aislados (n=35). A este conjunto se corrió el PCR Multiplex y fueron analizados paralelamente con el Vitek2®. (**Figura 23**)

Según los datos generados del PCR *versus* los resultados del perfil de resistencia a la meticilina del sistema Vitek2®, se enmarcan las cepas MRSA. Ajustando una tabla de 2x2 para analizar la potencia de la prueba genética a través índices de evaluación diagnóstica, previamente descritos. (*Ver Tabla 8*)

Resultados

Sensibilidad 71.40%

Especificidad 92.86%

Valor predictivo positivo 71.43%

Valor predictivo negativo 92.86%

Likelihood ratio test + + 10.00 **(Excelente Utilidad)**

Likelihood ratio test - - 0.31 **(Utilidad de nivel Regular)**

4.12.2. Gen *nuc* vs. Vitek2®

De la misma manera para estudiar la potencia diagnóstica, del PCR Multiplex que determina la presencia del gen *nuc*, se compara en la muestra a todos los aislamientos de *S. aureus* aislados con el resto de bacterias identificadas (n=68). Debido a que el gen *nuc*, teóricamente esta presente en especies *aureus*. A este conjunto se corrieron los genes del Multiplex estudiado y fueron analizados paralelamente con el Vitek2®. (*Figura 24*)

Se comparan las cepas que tengan o no el gen *nuc* versus los resultados del sistema Vitek2®, en *S. aureus*, se construye una tabla de 2x2 para las siguientes, usando las medidas de evaluación previamente descritas: (*Ver Tabla 9*)

Resultados

Sensibilidad 97.1%

Especificidad 88.75%

Valor predictivo positivo 79.07%

Valor predictivo negativo 98.61%

Likelihood ratio test + + 8.63 **(Buen nivel de Utilidad)**

Likelihood ratio test - - 0.03 **(Excelente Utilidad)**

5. CAPÍTULO: DISCUSIÓN

« Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas.

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones

y la fuente de vida de todo progreso.».

Louis Pasteur

Químico Francés,

Pionero de la “Edad de Oro de la Microbiología.”

5.1. Colonización bacteriana nasal

La colonización por *S.aureus* en las fosas nasales ha sido bien documentada en la literatura médica. Estos estudios de portadores se han realizado en individuos tanto de la comunidad como en los hospitales. Debido a que en la última década se ha reportado una incidencia importante de portadores de *S. aureus* en los trabajadores en granjas porcícolas, sobre todo en Europa, donde se ha identificado una importante colonización.

En este estudio, se encontró un 69.08% de colonización por *S. aureus* en los porcicultores, de la provincia de Pichincha. Un dato importante que concuerda con los datos reportados en la literatura.

En Chile un estudio realizado por *Platzer M. Liesbeth et al.*, describieron la flora bacteriana a nivel nasal e identificaron a *Staphylococcus* coagulasa negativo como la más frecuente; seguido en orden de frecuencia *S. aureus*, *Difteroides* sp., *Corynebacterium* sp. y *Streptococcus viridans*, lo que es similar a lo descrito por otros autores. En esta población, encontraron una prevalencia de *S. aureus* de 22.7% en una muestra de 454 participantes.¹¹⁷

Nadimpalli, Maya et al., en el 2014 en Carolina del Norte, en cuidadores que están al contacto con ganado porcino, se reveló que *S. aureus* una prevalencia de 72.7% (16/22)¹¹⁸ El estudio realizado en el 2012 en Alemania por *Oppliger, Anne et al.*, evidenciaron que en 75 individuos que trabajan con ganado porcino 44 (57%) presentaron colonización nasal de *S. aureu*.¹¹⁹

En este estudio además de los portadores de la especie *S. aureus*, se encontró también la especie *S. lugdunensis*, con una frecuencia de 5.21% (6 aislamientos). Se conoce hoy por hoy, que *Staphylococcus lugdunensis* es un patógeno oportunista que comparte una relación muy estrecha con la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, descrito por *Simon Heilbronner et al.*, En su estudio realizado en Dublín, Irlanda en 2011, explica que la colonización de esta bacteria asintóticamente puede oscilar entre el 1% al 5%, en piel y mucosas.¹²⁰ Es un nuevo aporte, debido a que es la primera vez que se reporta esta especie de *Staphylococcus* como colonizadora de las fosas nasales.

5.2. *S. aureus* meticilino resistente (MRSA) en cuidadores de ganado porcino.

Se encontró una prevalencia de 35/115 de *Staphylococcus aureus* (30,43 %). De estos, 7 aislamientos de los 115 hisopados (6.08%) presentaron resistencia a oxacilina (meticilina) considerándose MRSA. Por lo tanto la prevalencia de colonización nasal en trabajadores de granjas porcinas de la Provincia de Pichincha, es similar a lo reportado globalmente.

Estudios con pequeñas muestras de trabajadores como el de Nadimpalli, *Maya et al.*,¹¹⁸ que realizó un seguimiento en 22 porcicultores, identificó una sola cepa de MRSA (5%), algo similar con el estudio alemán de *Oppliger, Anne et al.*,¹¹⁹ de su muestra de 75 hisopados nasales, 5 fueron MRSA (6.6%).¹⁰² En Singapur, en el 2007, *Sergio et al.*, en 29 trabajadores de granjas porcinas, la colonización nasal de MRSA fue en un caso (2%).¹²¹

Voss y colaboradores, en los Países Bajos en 2005, por primera vez en Europa se reportaron 6 aislamientos de colonización nasal en trabajadores de granjas porcinas, confirmada genotípicamente con la presencia del gen *mecA*.¹²² Quienes añaden que no sólo los cerdos son el único reservorio, también se puede encontrar en ganado bovino, vacuno y en perros.¹²² En el 2008, *Meemken et al.*, en Alemania, se hisopa a 86 trabajadores porcícolas, evidenciando 20 aislamientos de colonización nasal por MRSA.⁸⁹ En China en el mismo año, *Cui et al.*,¹²³ de 13 individuos 3 cepas de MRSA. Al año siguiente con la misma metodología, en Malasia *Neela et al.*,⁶² se aisló 5 cepas (5.5%) de MRSA de 90 porcicultores. En España, *Morcillo et al.*, En el

2012, se identificó una prevalencia del 9.3% de 54 porcicultores portadores de MRSA.¹²⁴ *Khanna et al.*, en el año 2008, en Canadá encontró una prevalencia de MRSA del 20% en cuidadores de granjas porcinas.¹²⁵

Estudios con un número de muestra mayor como el realizado en Irlanda, por *Horgan et al.*, en sitios de producción porcícola por 2 años (2007-2009), recolectaron 101 muestras aislando 2 aislamientos (2%) de MRSA nasal.¹⁰¹ *Huber et al.*, en el año 2012, en Suiza realiza una investigación de detección de MRSA en 148 granjeros y 133 veterinarios en contacto con cerdos, encontraron que todos los granjeros eran negativos para MRSA y solo 4 veterinarios eran positivos.¹²⁶

En el año 2012, *Porphyre T. et al.*,¹⁰⁰ concluye acerca de la prevalencia del MRSA a nivel nasal en porcicultres, un corolario muy importante:

“La ganaderos porcícolas están susceptibles a la colonización de MRSA y potencialmente de producir una cadena de contagio, sin embargo existen dos parámetros al estudiar la prevalencia en estos individuos. Cuando iniciaron los estudios, se notificó que porcentajes del 20% a 35% de MRSA. **Si bien estas cifras pueden parecer alarmantes, deben ser interpretados con cautela.** Debido a que, estudios recientes con mejores tamaños de muestras y factores de precisión estadística, han indicado que la colonización nasal está presente en razón del 7%-9%.”¹⁰⁰

Si bien no está claro el origen, las teorías apuntan a que la transferencia puede ser bidireccional, entre el cuidador y el cerdo, debido al abuso y mal uso de antibióticos en ambas poblaciones que pueden generar una metilicilino resistencia. En la

actualidad se conoce, que la vestíbulo nasal en animales y humanos es un lugar propicio para la subsistencia del *S. aureus* pero tampoco se niega otros lugares como el periné, el recto, las zonas intertriginosas, faringe e incluso superficies palmares sean también zonas que pueda habitar esta bacteria, *ergo* las superficies físicas de las estructuras de las granjas, que están contiguas a los cerdos y sus desechos, son potenciales vectores de transmisión entre el mismo ganado y sus cuidadores.^{100,101}

5.2.1. Datos demográficos

Los trabajadores de las granjas porcícolas de la provincia de Pichincha tienen una edad promedio de 46 a 60 años, todos en la adultez media; tanto en hombres como en mujeres. En la muestra la edad mínima fue de 18 años y la máxima 72 años. 79 mujeres y 36 eran hombres en total.

De acuerdo con el estudio realizado en Tenerife, España, en el 2010, por *Morcillo Rehberger A.* reportó el porcentaje de aislamiento de MRSA que en cuidadores de ganado porcino fue del 9.3% (5/54).¹²⁴ Todos de género masculino y su grupo etario en la mayoría cursaban su adultez media.¹²⁴ En el 2009 en Italia, *Monaco Monica et al.*, informaron que el promedio de edad de los cuidadores de ganado porcino fueron portadores de MRSA a nivel nasal, oscilaba entre los 58 años, correspondiente al grupo etario del adulto medio (46-60 años).⁴²

5.3. Factores de exposición medidos con riesgo relativo

Existen varios estudios que han comprobado que mientras un individuo este expuesto más al ambiente de crianza del ganado porcino, será proporcional el riesgo

de adquirir una cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina.¹⁰¹ En la presente tesis, se demostró que los cuidadores de ganado porcino, que laboraban la jornada completa (8 horas diarias) y que han dedicado más de 15 años a esta actividad, representaba un riesgo relativo del 2.53 y 4.79 respectivamente. En comparación con estudios similares, se encontró que si existe un riesgo proporcional al tiempo de exposición al contacto estrecho con cerdos y su transmisión de MRSA.

Una investigación en Holanda, publicada en “*British Medical Journal*”, en el 2013, por *Dorado-García A. et al.*,⁹⁹ reveló, los riesgos relacionados de porcicultores y la colonización nasal de MRSA, sus resultados demostraron que el uso de antibióticos administrados en los últimos 3 meses al ganado se asociaba a un riesgo relativo (**RR**) de colonización de MRSA de un 3.8. Otro factor evaluado fue la carga horaria promedio, donde se afirmó que más de 20 horas promedio por semana marcaría un RR de 2.5. Asimismo, publicaron los factores de protección (**FP**), que evitarían la colonización, tales como el uso de toallas y métodos de limpieza dentro de los ambientes de la granja con valor de protección de 0.6 y el uso de diferentes vestuarios, en las diferentes zonas laborales, el FP fue del 0.5.

En un estudio reciente en 2014, realizado por *Dahms et al.*,¹²⁷ en Pomerania, Alemania, se hisoparon 78 ganaderos porcícolas, a nivel nasal y orofaríngeo, en forma seriada. Se encontraron 20 participantes portadores de MRSA (25.6%), donde se evidenció que las personas que eran portadoras asintomáticas, trabajaban promedio al día un promedio de 8 horas al día, mientras que las que no estaban colonizadas. Otro factor de riesgo ambiental que es interesante, fue el obtener

hisopados ambientales, en los corrales donde viven los cerdos, encontraron 6 cepas de MRSA sobre la muestra de 17 colecciones; correlacionando, que el factor temporal *versus* exposición directa al ganado y al ambiente, incrementa el riesgo de ser portadores de MRSA a nivel nasal en los trabajadores.

En 2013, *Mónaco M. et al.*,⁴² en Roma, comparó poblaciones expuestas a la labor porcícola frente aquellas personas que solo van de visita a las granjas, encontrando que los cuidadores de cerdos que tienen más años de trabajo, posee un riesgo relativo de 3.2 veces más alto con la población transitoria. Incluso se afirmó que las cepas de MRSA, poseen resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, clindamicina y eritromicina, que es muy común a nivel comunitario.

Las vías de transmisión potenciales fueron especificadas en un amplio estudio en el Reino Unido, en el año 2012, realizado por *Porphyre T. et al.*,¹⁰⁰ se propuso un modelo de transmisión de meticilino resistencia en los *S. aureus* y las personas que pueden estar en riesgo de colonización por MRSA (**Figura 25**). Entre ellos, cinco poblaciones están al contacto directo presentan mayor riesgo estos son: fuerza de trabajo principal, explícitamente porcicultores (**F**) y sus animales de compañía - mascotas (**FCA**) que circulan dentro de la granja de cerdos, otra población en riesgo son los veterinarios porcícolas (**VP**), los transportadores o distribuidores de ganado porcino (**T**) y los encargados de los cerdos en el matadero en inglés *Slaughter house workers* (**SHW**). También se toma en cuenta a poblaciones que indirectamente pueden ser portadoras, como los veterinarios de las mascotas (**V**), las familias de los porcicultores y de toda la red laboral (**GH**), junto con sus animales de compañía en

los hogares (CA). Esta red de contagio de MRSA, ha ampliado el campo de investigación en la Medicina humana y Veterinaria, sugiriendo que la colonización nasal no solo está enfocada a los porcicultores, sino en toda la cadena laboral involucrada, debido a ello se recomienda hisopar a todos los individuos relacionados con esta actividad, con el fin de identificar la transmisibilidad del MRSA en la comunidad con relación al ganado porcino.

5.4. Utilidad del CHROMagar MRSA®

En el presente estudio, de 35 aislamientos de *S. aureus*, inoculados en este medio, se obtuvieron 2 falsos positivos y un falso negativo, se obtuvo una sensibilidad 85.71%, especificidad 92.80%, un valor predictivo positivo 75.00%, valor predictivo negativo 96.30%, un LR positivo 12.00 (excelente utilidad) y un LR negativo 0.15 (Buen nivel de utilidad). Resultados que contrastan con la utilidad encontrada en varios estudios de evaluación diagnóstica de este medio.

En una investigación, en el Japón en 2004, evaluó en ese entonces un nuevo medio cromogénico para el aislamiento de MRSA, el CHROMagar MRSA®, Haruhiko taguchi *et al.*, con la Facultad de Medicina, de la Universidad de Kyorin, concluyeron que CHROMagar MRSA®, logra 100% tanto en especificidad y sensibilidad útil para la detección del *S. aureus* resistente a la meticilina.⁷⁷ Un año después, en los Países Bajos, Bram Diederén *et al.*, en una muestra 216 cepas de MRSA y 241 MSSA. La sensibilidad de CHROMagar MRSA®, después de 24 h de incubación fue de 95,4%, aumentando a 100% después de 48 h. La especificidad ya era 100% después de 24 h.¹²⁸ No obstante, un estudio reciente en Febrero/2014, en

Bélgica *Marina Mukovnikova et al.*, evaluaron la eficacia de este método, en una muestra de 1200 hisopados, donde el 92.9%, 99.7%, 81.3% y el 99.9% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo respectivamente, fueron reportadas en este estudio. Con un LR positivo de 30 y LR negativo de 0.07; representado una excelente utilidad en ambas razones de verosimilitud.⁴⁸

5.5. La prueba de coagulasa en *S. aureus*

El presente estudio varias especies de *S. coagulasa* negativos identificadas, 15 fueron falsos positivos (*S. lugdunensis* y *S. sciuri*). De los 35 aislamientos de *S. aureus*, en uno la coagulasa resultó negativa. Calculándose, una sensibilidad y especificidad baja con respecto a los estudios de evaluación de coagulasa como método fenotípico en *S. aureus*, con valores de 82.86% y 81.85% respectivamente; con coeficientes de verosimilitud (LR) con un nivel regular de utilidad. Comparando con otras investigaciones de igual metodología, como en la India, 2008 por *Tiwari HK et al.*, comparó los diferentes métodos fenotípicos de diagnóstico para el *S. aureus*, se determinó que la prueba del tubo de la coagulasa mostró muy buena sensibilidad (98,7%), especificidad (98,1%), PPV (99,5%) y VPN (94,4%).⁸²

Otro estudio multicéntrico, en el 2001, por *Arjanne van Griethuysen et al.*, publicado en la Sociedad Americana de Microbiología, determinó que los aislamientos más frecuentes que suelen ser falsos positivos ante la coagulasa son especies de *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* y *S. haemolyticus*.

Otra investigación en Turquía en el año 2011, *NS Osen et al.* el test de la coagulasa en 24 horas, identificó correctamente 57 especies (95%) de 60 *S. aureus* aislados.¹²⁹

Este mismo estudio fue evaluado en el 2014, por *Sandeep Thirunavukkarasu et al.*, En Bangalore, India, se evaluó la utilidad de la coagulasa, donde se informó una sensibilidad del 84.1% y 90 de especificidad.^{87,129}

5.6. Perfiles de resisitencia de los *S. aureus* aislados

En un estudio en Italia, en el año 2009, realizado por *Monica Monaco et al.*, informó de 9 cepas MRSA sin criterios nosocomiales, y en relación con el ganado porcino se encontraron dentro 879 pacientes (1%). Por medio del sistema Vitek2®. De estas 9 cepas, 7 cepas (77.7%) resistentes a tetraciclinas, 4 cepas (44.44%) fueron resistentes a eritromicina, levofloxacina y clindamicina, 1 cepa (11.11%) a gentamicina y 1 cepa (11.11%) a trimetoprima-sulfametoxazol.⁴²

Uno de los estudios más completos actualmente que ha detallado los perfiles de resistencia antimicrobiana en *S. aureus*, es el de *Oppliger, Anne et al.*, Realizado en 2012, reportando resistencia a la tetraciclina en 39 cepas (52%), frente a la eritromicina 20 (27%), clindamicina 17 (23%), penicilina 56 aislamientos (75%), trimetoprima-sulfametoxazol 3 cepas (4%), ciprofloxacino y levofloxacino igual proporción de resistencia 6 (8%), y no existió resistencia a la gentamicina.¹¹⁹

En esta tesis, el sistema Vitek2® generó los siguientes informes de los 35 asilamientos de *S. aureus*, 32 cepas (91.4%) resistentes a la penicilina, 4 resistentes (11.4%) a la gentamicina, en el grupo de las quinolonas 3 cepas (8.6%) fueron identificadas como resistentes a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino. Un valor muy similar a la proporción de *Oppliger*, de 8%.

La eritromicina, con 13 aislados (37.1%), seguido de la resistencia a la clindamicina 11 cepas (31.4%), Presencia de metilasa (28.6%) se encuentran relativamente más altas comparadas con las de *Oppliger*.¹¹⁹ También se encontró una proporción reducida de resistencia a la tetraciclina 9 aislamientos (25.7%) frente al 52% de *Oppliger*. En todos estos estudios no se encontró resistencia a la rifampicina, vancomicina ni linezolid, datos que concuerdan con los hallazgos del presente estudio.

5.7. Presencia de genes *nuc*, *mecA* y *luk s/f* codificantes de PVL en los *S. aureus* aislados.

La identificación genotípica en los *S. aureus* meticilino resistentes, se determinó primeramente por la identificación del gen *nuc*, específico de la especie *aureus*, seguido el gen *mecA*, que otorga la meticilina resistencia y los genes *luk s/f* que codifican a la toxina PVL.

Para comparar la presencia del gen *nuc*, se requirieron los 35 aislamientos de *S. aureus* junto con las otras especies de *Staphylococcus* reportadas por el sistema Vitek2® y se evidenció del total de *S. aureus* un aislado no poseía este gen, y que incluso especies como *S. lugdunensis* y *S. sciuri*, presentaron gen *nuc* positivo. Por lo que se obtuvo una sensibilidad 97.1%, especificidad 88.75%, valor predictivo positivo 79.07% y negativo 98.61%, con coeficientes de verosimilitud (LR) positivo + 8.63 (Buen nivel de Utilidad) y negativo - 0.03 (Excelente Utilidad).

El siguiente gen en identificar fue *mecA* que de 7 aislamientos de MRSA por el sistema Vitek2®, 5 presentaron este gen. Evaluando de esta manera su potencia

diagnostica con una sensibilidad 71.40%, especificidad 92.86%, valor predictivo positivo 71.43% y negativo 92.86%, con coeficientes de verosimilitud (LR) positivo de + 10.00 (Excelente Utilidad) y negativo - 0.31 (Utilidad de nivel Regular).

Comparando estos resultados con otros estudios con igual metodología, se puede contender que las pruebas genotípicas pueden tener variante genéticas, que afecten su sensibilidad y especificidad para la identificación bacteriana. Sin embargo, siguen siendo un referente al momento de confirmar en este caso la especie *aureus* y la resistencia a la meticilina. Por ejemplo un estudio con similar, que compara las pruebas fenotípicas y genotípicas, para la tipificación de cepas de *S. aureus* y la identificación resistencia a la meticilina, que se realizó en 2014, en Bagdad, Irak; por *Dhafar Al-Ugaili et al.*, comparó 23 cepas de MRSA identificadas por Vitek2® *versus* la presencia de genes *nuc* y *mecA*. Se evidenció que el 100% de aislamientos presentaban el gen *nuc* específico de la especie, no obstante 19 (82.6%) presentaron el gen *mecA*.⁸⁰ Por lo que se investigó las posibles causas que otorgarían la meticilina resistencia en estos aislados *mecA* negativos, planteándose una hipótesis, de la posible “hiperproducción” de β -lactamasas como causa.⁸⁰

Fang, H., y Hedin, G, describieron en un estudio publicado en el *Journal of Clinical Microbiology*, la utilidad comparada de la PCR en tiempo real para la identificación del gen *nuc*, en 304 muestras, y obtuvieron *S. aureus-nuc* negativas. Determinando que para esa investigación este método de detección de *S. aureus*, mantuvo un 93,3% de sensibilidad, 89.6% de especificidad.^{130,131}

Otro estudio de investigación, realizado en Helsinki, Finlandia, en enero de 2010, por *Pasanen T. et al.*, en el cual, evaluaron la utilidad de la PCR para la detección de los genes *nuc* y *mecA*, en 128 muestras, se comprobó que la PCR-Dúplex maneja una sensibilidad del 93.5%, especificidad del 88.6%, un valor predictivo positivo del 17.3% y negativo del 99.8%. En comparación con los métodos fenotípicos, recomendando que las pruebas genotípicas son una alternativa para la práctica adicional, pero que se debe tomar en cuenta la concordancia clínica.¹³²

Con respecto a la prevalencia de PVL en la muestra total (5.21%), es muy similar a la estudiada por otros autores como *Pizarro Velasco C.* que en 108 muestras 11 aislamientos de *S. aureus* (10.2%) eran PVL positivos.¹³³ *Graham K.* concluyó que la prevalencia de PVL en MRSA de la comunidad es completamente casual, ya que encontró <5% de *S. aureus* posee los genes que codifican la toxina PVL.¹³⁴ Un estudio en el 2012, por *Cheikh Fall et al.*, que estudió la presencia de MRSA en cerdos y sus cuidadores, de 52 muestras en humanos 7 fueron *S. aureus* PVL positivos.¹³⁵

6. CAPÍTULO: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

«Si tenéis el hábito de tomar las cosas con alegría,
rara vez os encontraréis en circunstancias difíciles.

Si no vives para servir, no sirves para vivir.».

Sir Lord Robert Baden Powell of Gilwell

Fundador del Movimiento Scout Mundial, Jefe Scout Mundial

6.1. Conclusiones

- Existe una prevalencia de colonización de *S. aureus* de un 30.04% (35/115) comparado con las investigaciones descritas de flora bacteriana nasal, esta proporción es similar en los porcicultores.
- Así como también se aisló *S. aureus* a nivel nasal, se ha descrito por primera vez que en porcicultores en el Ecuador la colonización de *S. lugdunensis*. Un patógeno oportunista que puede estar presente asintomáticamente en mucosas, hasta en un 5% descrita por otros estudios, que coincide con la proporción encontrada del 5.21% de toda la muestra.
- La prevalencia de MRSA en cuidadores de ganado porcino es del 6.08% (7/115), coincide con las tasas reportadas globalmente. También se puede obtener una proporción de los 35 *S. aureus* aislados 7 fueron MRSA representando el 20% dentro de los aislamientos de esa especie.

- Adicionalmente se puede aseverar que la prevalencia de en cuidadores de ganado porcino. Depende mucho del número de participantes en las muestras, debido a que se evidenció un amplio intervalo de frecuencias alrededor del mundo, en muestras relativamente menores (<40) comparadas con aquellas que superaban los 100 individuos, donde su prevalencia oscila entre el 7% al 9%.
- Datos demográficos como la edad, han coincidido con los estudios descritos, que la mayoría de portadores de MRSA, se encuentran en el grupo etario de adultez media (45-60 años). Con un predominio en mujeres (4 aislamientos) frente a los hombres (3 aislamientos), por lo que indistintamente el sexo no parece ser un factor influyente al momento de ser colonizados.
- Se puede afirmar que junto con la literatura y este estudio, que los factores de riesgo como son la carga horaria promedio (jornadas completas) y los años dedicados a esta actividad, son proporcionales al tiempo de exposición y de adquisición de MRSA nasal.
- Hoy en día está claro que los porcicultores no son la única población en riesgo de colonización de MRSA a nivel nasal, sino también todos individuos que cumplen un rol en la cadena de producción de ganado porcino. (veterinarios, familias, encargados en el matadero) así también como sus animales de compañía.
- Si bien el CHROMagar MRSA® es un agar ideal para el crecimiento y aislamiento de *S. aureus* resistentes a meticilina, sin embargo se encontró 2 falsos positivos y 1 falso negativo, con valores de 85.71% y 92.80%, de

sensibilidad y especificidad respectivamente. Sin embargo, esta prueba posee una excelente utilidad clínica, debido a que permite el crecimiento de colonias de MRSA específicas, cumpliendo adecuadamente su rol como método fenotípico, no obstante siempre se debe complementar la identificación bacteriana con los criterios clínicos y genotípicos.

- Si bien el test de la coagulasa en 24 horas, es un método cotidiano para la diferenciación de *S. aureus*, en el presente estudio se obtuvo un 82.86% y 81.85% de sensibilidad y especificidad, respectivamente. Si bien, los índices de verosimilitud para esta prueba fueron de un nivel regular de utilidad, no se descarta que esta prueba deba realizarse como entrada, para identificación bacteriana en sospecha de especie *aureus*. Solo se debe tomar en cuenta, que *S. aureus* no es el único productor de esta enzima sino otras especies. Por lo que siempre se necesitará de otras pruebas fenotípicas y/o genotípicas para la confirmación de especie.
- La literatura científica concuerda con el presente estudio al referirse que *S. aureus* de la comunidad, pueden también presentar resistencia en gran escala a la penicilina (91.4%), como también a macrólidos (37.1%), clindamicina (31.4%), y ligeramente a trimetoprima-sulfametoxazol (5.7%), siendo estos 3 últimos los más usados y recomendados en el tratamiento en infecciones de partes blandas por MRSA/MSSA de la comunidad. Por lo que se sugiere tener presente estas frecuencias a la hora de emitir un tratamiento.
- No se ha evidenciado resistencia en la comunidad de ningún aislamiento de *S. aureus*, frente a vancomicina, linezolid, ni rifampicina.

- La resistencia ante quinolonas coincide con los estudios encontrados, en aislamientos de *S. aureus*, en una frecuencia del 8%.
- La prevalencia de los genes *luk s/f*, que codifican a la toxina, la leucocidina Pantón-Valentine, fue del 5.21% de los 115 individuos. Dentro de los 35 *S. aureus* aislados se encontró 6 cepas indistintamente entre MRSA (1/6) y MSSA (5/6). Eso significa que la colonización nasal de *S. aureus* PVL positivos, en los seres humanos, parece ser baja, y no se relaciona su presencia con la meticilino resistencia, por lo que no representa un riesgo amenazador para la transmisión entre la comunidad.
- Con la presente tesis, se puede concluir que tanto los métodos fenotípicos y genotípicos poseen márgenes de error, y que con el tiempo estos cada vez son perfeccionados, es por eso que determinar una prueba de referencia única, sería un proceder erróneo. Al contrario, el uso de todos los métodos descritos potenciará conjuntamente los resultados emitidos, llegando a una identificación más precisa.

6.2. **Fortalezas del estudio**

- La fortaleza epidemiológica que tiene este estudio es el cálculo de la muestra, pues se maneja un error mínimo del 0.05, con adecuada precisión y se superó con el 10% de lo previsto. Afianzando, los resultados estadísticamente más sólidos.
- El cálculo de la muestra, se edificó de acuerdo con varios estudios alrededor del mundo, que mantengan similares objetivos y metodología, se explica

detalladamente los autores y las muestras que manejaron, como también valores aberrantes, que podrían confundir al momento de leer prevalencias. Más aún si un estudio en porcicultores y su relación con la colonización de MRSA nasal, en el Ecuador no se ha llevado a cabo.

- El manejar criterios clínicos de inclusión y exclusión para los participantes, determina de manera más precisa la población que queremos estudiar, en este caso el haber seleccionado a cuidadores de ganado porcino excluyendo contacto con hospitales u otro tipo de riesgo nosocomial dentro de los criterios de exclusión permite conocer en buena manera en la prevalencia de cepas de MRSA meramente comunitario.
- El proponer variables clínicas que sugieran sospecha de exposición a la resistencia a la meticilina, hace que el estudio sea más dinámico y no solamente englobado a una prevalencia; sino también al poder establecer el origen de índices estadísticos generados, por los diferentes factores ambientales que el cuidador porcícola, pudiera estar expuesto como las horas diarias dedicadas y la trayectoria laboral, entre otras variables.
- En microbiología, para la identificación de *Staphylococcus aureus* se utilizaron las pruebas convencionales o clásicas que se realizan en forma manual, sino también por pruebas fenotípicas y genotípicas, todo ello asegura la identificación en forma precisa y confiable de los aislamientos de MRSA.
- Finalmente, el evaluar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* mediante el estudio genético recalca que la microbiología es tan variante como sus bacterias, la flexibilidad de su único cromosoma enrollado permite tantos

cambios en poco tiempo. Puede que una prueba considerada como Gold Standard, cambie en corto tiempo lo que nos asegura no se manejen verdades absolutas. Siempre hay que considerar la flexibilidad e índices de error en las pruebas diagnóstica, como en todo examen de laboratorio clínico.

6.3. Debilidades del estudio.

- Una gran barrera al momento de realizar el estudio es el obtener información acerca de las granjas y su ubicación; muchas de estas se encuentran en zonas rurales, donde existe desconfianza de ser estudiados. No toda la población participó con plenitud en el proyecto, por temor a conocer los resultados que puedan afectar a su producción.
- Estudios actuales han sugerido que el hisopado es la mejor vía para poder aislar al *S. aureus*, se ha demostrado que el vestíbulo nasal es una de las zonas más propicias, sin embargo se recomienda que al menos en dos lugares con mayor frecuencia de colonización se deban hisopar y no solo por una ocasión; sino en al menos 3 intervenciones, espaciadas entre semanas y meses. Así, muchos definen a *S. aureus* como transitorios o perennes.
- Existen factores de protección para romper con las cadenas de transmisión, como son simples métodos de asepsia y antisepsia en los corrales y en el material usado para el cuidado de ganado. La vestimenta propia para cada galpón, el uso de antisépticos como al clorhexidina en las manos de los porcicultores al momento antes de rotar de ambiente, la limpieza previa al ingreso y salida en cada criadero, la restricción de visitas. Las visitas fueron

cortas por lo que esta educación se implementó de manera breve. Habría que profundizar este aprendizaje de ruptura de la cadena de transmisión en los trabajadores agrícolas.

- La investigación en cerdos tanto a nivel nasal, rectal, perineal y/u orofaríngeo, ha demostrado reforzar el hallazgo de cepas MRSA que no pueden estar presentes en un solo lugar en el cuerpo del animal. Como también, se ha sugerido que se debe hisopar las superficies en contacto con los cerdos, para corroborar la presencia de estas cepas en zonas inertes y así ser vectores de transferencia por contacto.
- Se ha estudiado adicionalmente que el uso de antibióticos no solo en el humano sino en los cerdos, pueden generar resistencia antibiótica, el registrar esos datos enriquecería *a posteriori* teorías del origen de la resistencia a la meticilina, de origen comunitario asociado al ganado.
- Se recomienda para un próximo estudio hisopar a las familias de los cuidadores de ganado porcino, veterinarios, personas externas a las granjas como comerciantes o personas en los camales (sitios de sacrificio), junto con otros tipos de animales que puedan coexistir en las granjas como mascotas, ganado vacuno, bovino y/o aves de corral; para comparar los riesgos de exposición y de transmisión, aquello concebiría una idea más amplia de la difusión del MRSA comunitario.

6.4. Recomendaciones

- En el caso de los cerdos y otros animales, se ha descrito que pueden actuar como reservorios, junto con los cuidadores que mantienen contacto directo entre sí, veterinarios, comerciantes y por ende con sus familiares. Formándose una cadena de dispersión del MRSA. Por lo que se necesita más estudios que valoren la colonización nasal en estas poblaciones sea en animales de granja o domésticos como en los humanos.
- Se ha descrito que para romper esta cadena, existen medidas óptimas para como son: la higiene de manos, cambio constante de vestimentas diferentes para cada ambiente, precauciones de contacto como uso de los métodos de barrera (guantes) y descolonización así como limpieza ambiental y de superficies. Directrices simples, que han evidenciado la disminución de la de colonización de MRSA

FIGURAS

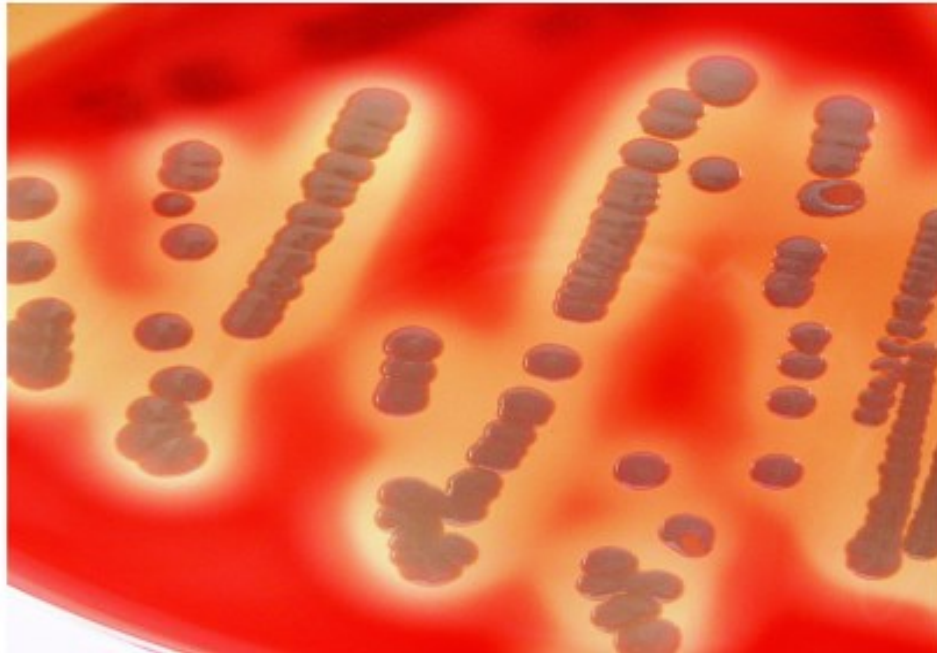


Figura 1. Colonias de *Staphylococcus aureus* en agar sangre: característica de esta bacteria, la formación de colonias doradas. (Imagen tomada del libro, “infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*” de Albert Pahissa Berga)

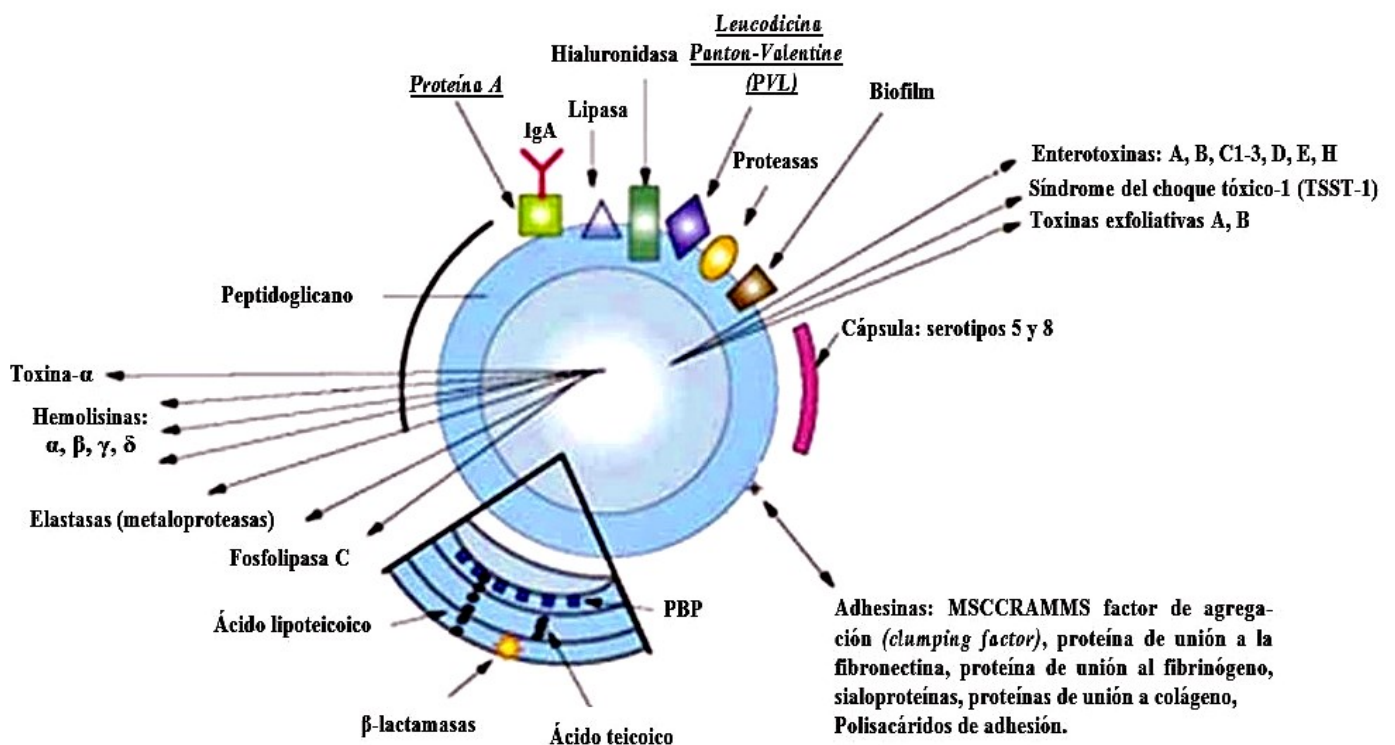


Figura 2. Factores De Virulencia Del *S. aureus*. (Imagen tomada del artículo, “Cervantes-García Et Al. Características generales del *Staphylococcus aureus*. 2014; 61(1):28–40.)

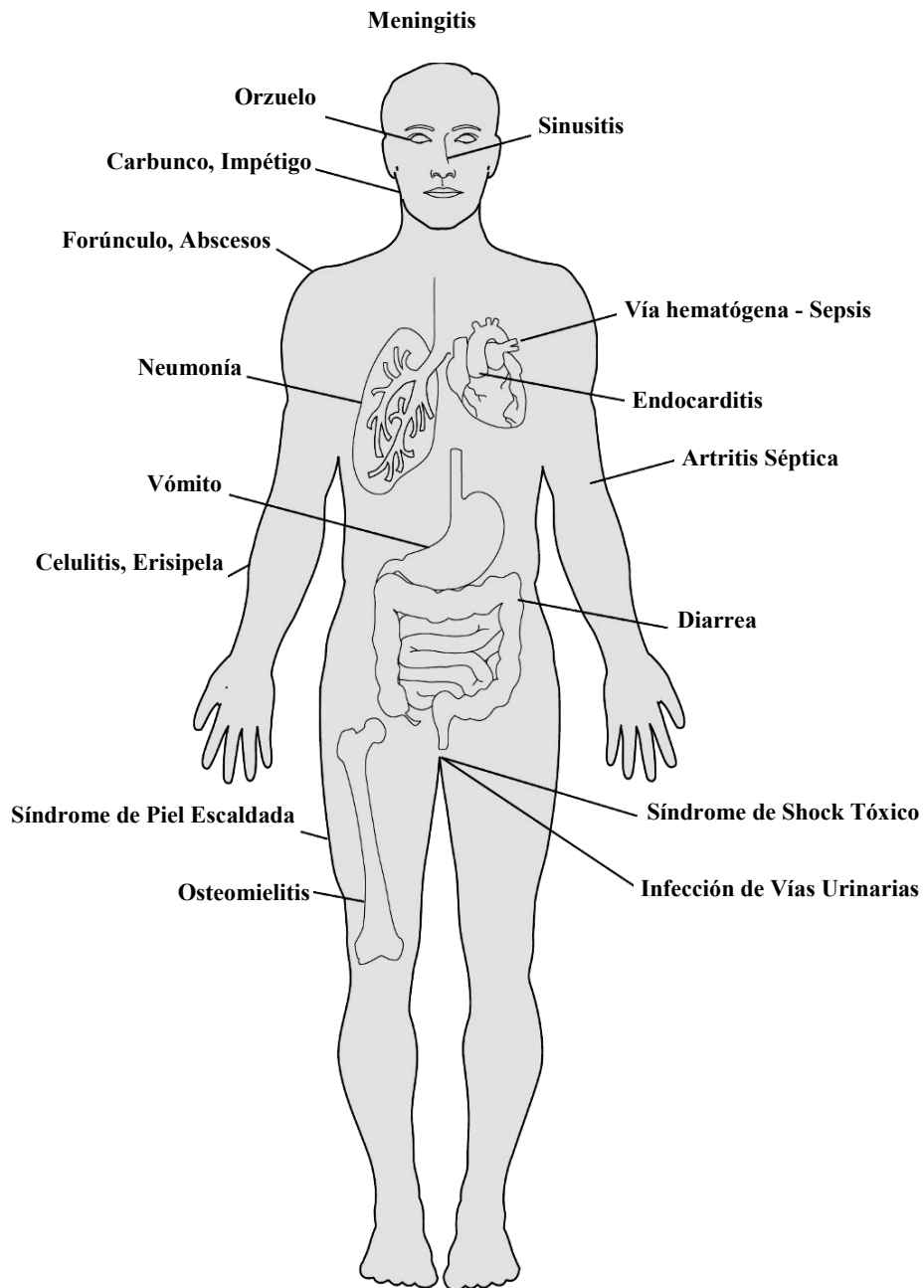


Figura 3. Sitios de Infección comunes del *Staphylococcus aureus*: (Imagen que ha sido modificada y traducida de la su original que fue tomada del libro de Melles DC. Natural Population Dynamics and Carriage of *Staphylococcus aureus*. 2008. Pg. 20).

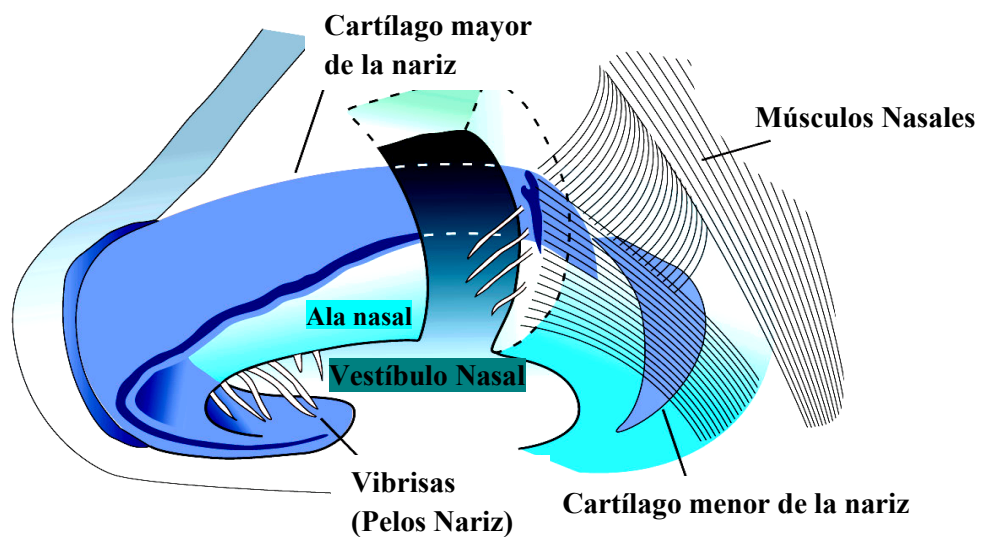


Figura 4. Anatomía Interna de las Narinas Anteriores: Diferentes factores que aseguran la humidificación y aclimatación del ingreso del aire. Lugar propicio de colonización para la adherencia del *S. aureus*. (Imagen que ha sido modificada y traducida de la su original que fue tomada del libro de Melles DC. Natural population dynamics and carriage of *Staphylococcus aureus*. 2008. Pg. 30)

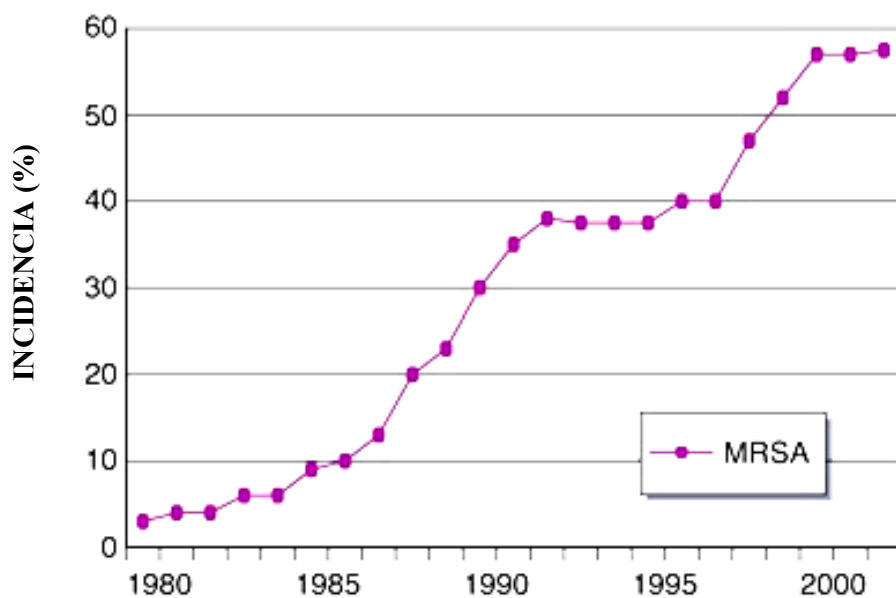


Figura 5. Tendencia in crescendo de las tasas de incidencia de MRSA en los últimos 30 años. (Imagen que ha sido modificada y traducida de la su original que fue tomada del libro de Melles DC. Natural Population Dynamics and Carriage of *Staphylococcus aureus*. 2008. Pg. 75)

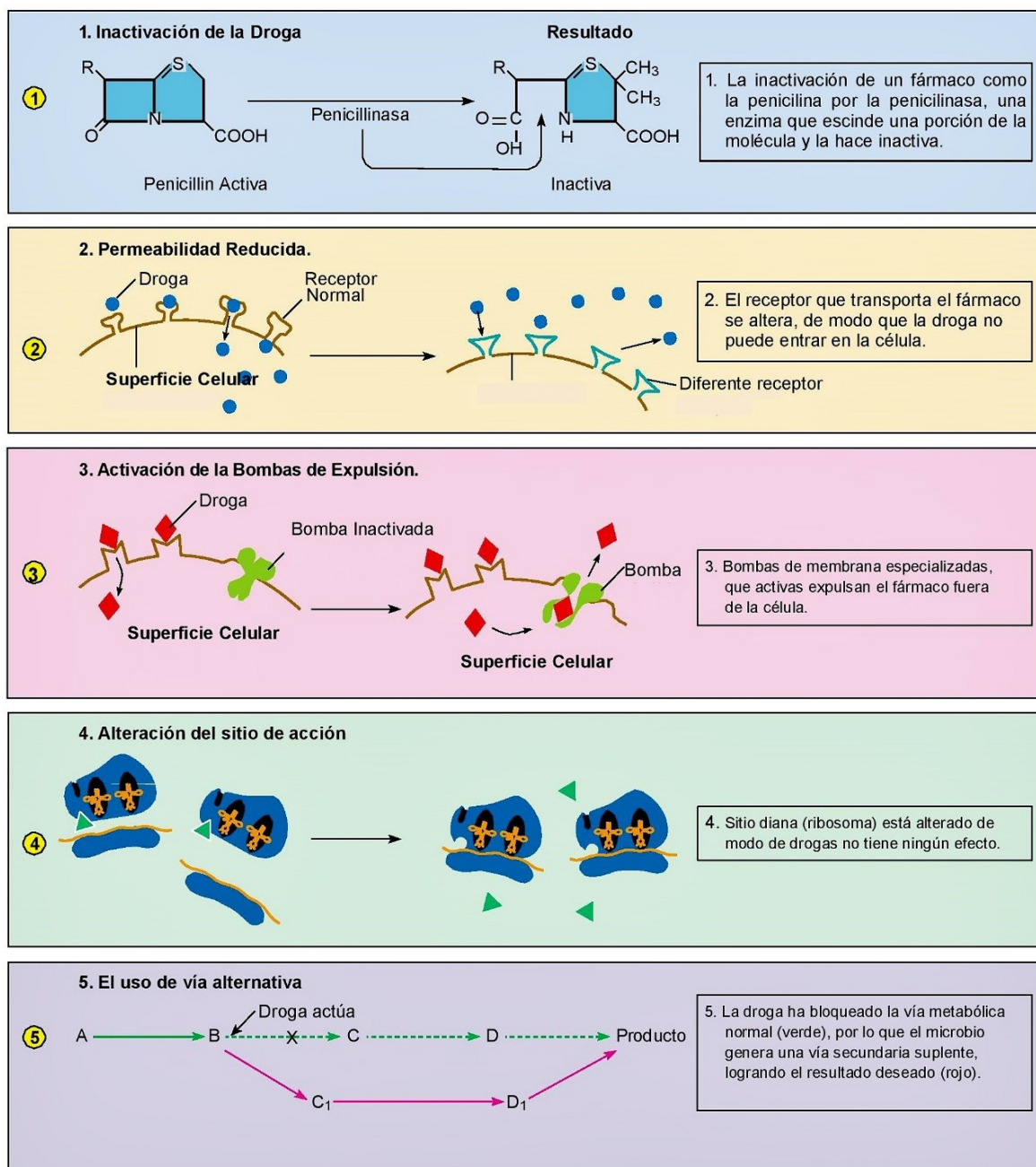


Figura 6. Mecanismos de resistencia Bacteriana (Imagen modificada y traducida por Sebastián Rivadeneira, tomada del capítulo de resistencia a antibióticos, del Libro de *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases Edición 2014*)

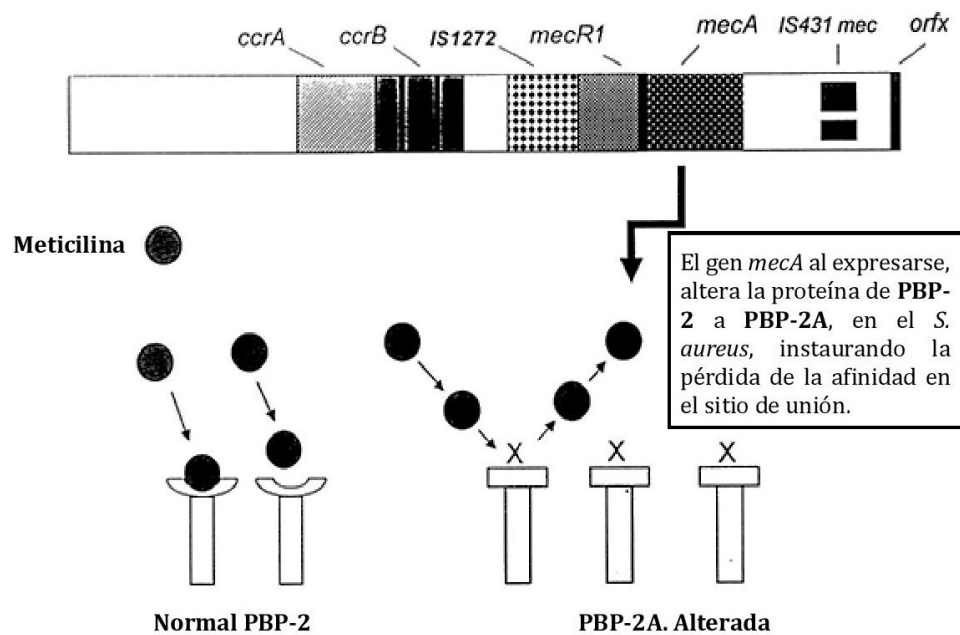


Figura 7. Mecanismos de acción para activar el gen *mecA* y la formación de PBP-2A. (Imagen que ha sido modificada y traducida de la su original que fue tomada del libro de Melles DC. Natural Population Dynamics and Carriage of *Staphylococcus aureus*. 2008. Pg. 120)

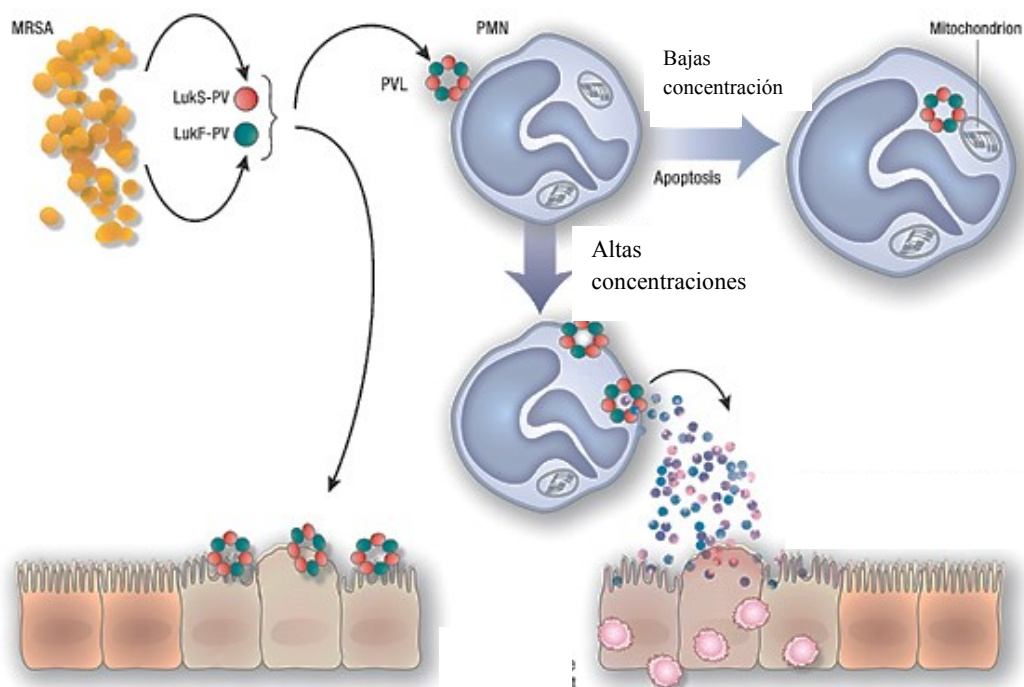


Figura 8. Mecanismos de acción de los genes codificantes *luk s/f* para PVL. Mecanismo de acción de la Toxina PVL en bajas y altas concentraciones, y sus acciones citotóxicas. (Imagen Tomada de Zaidi T, Zaidi T et al. *Staphylococcus aureus* corneal infections: effect of the Pantón-Valentine leukocidin (PVL) and antibody to PVL on virulence and pathology. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Jul. 54(7):4430–8.)

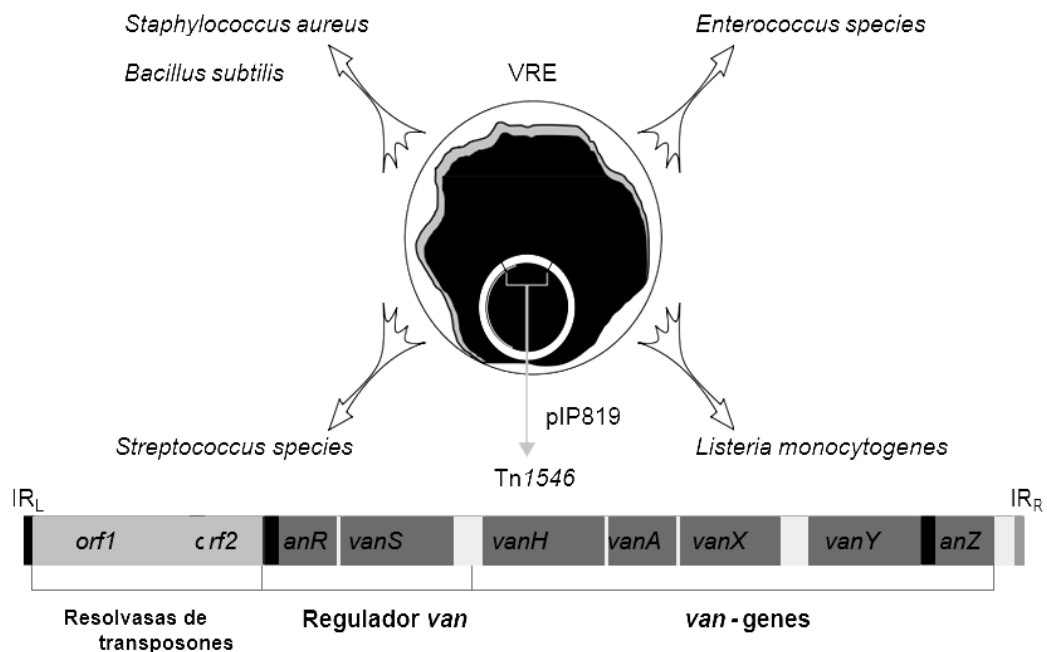


Figura 9. La resistencia a la vancomicina. En *enterococos* resistentes a la vancomicina (VRE) se puede transmitir activamente por una variedad de bacterias Gram positivas a través de un plásmido conjugado. El transposón que alberga el complejo de genes *vanA*, Tn1546, se realiza por conjugación. Este plásmido es altamente transmisible a varias especies de bacterias como la *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes* e incluso a *Staphylococcus aureus*.

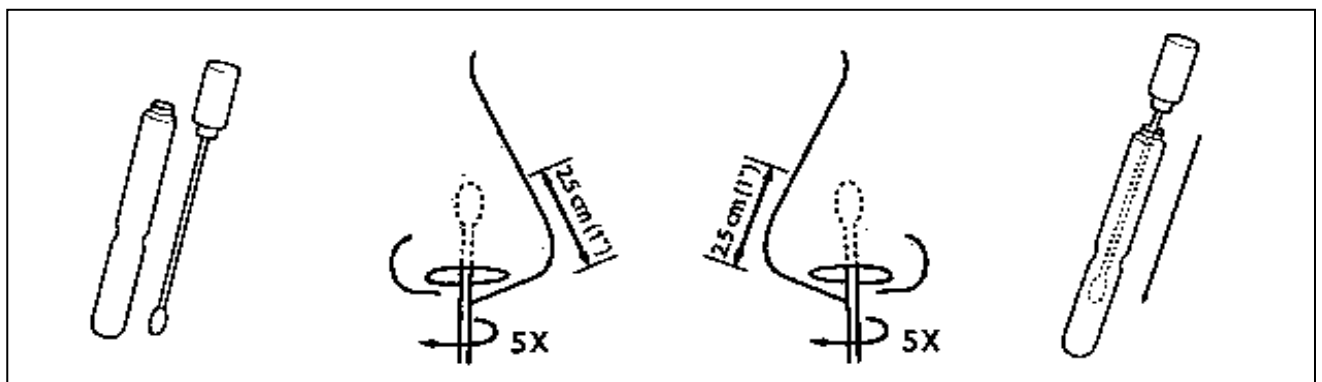


Figura 10. Procedimiento adecuado de hisopado nasal anterior, protocolizado por la CDC. (Figura tomada del Manual de procedimientos Médicos del Centro de prevención de enfermedades de los Estados Unidos)

LEYENDA

- UBICACIÓN GRANJAS PORCINAS
- EDIFICACIONES AGROCIUDAD
- PLANTA CENTRAL
- AGENCIA LOCAL
- CAMPER
- COORDINACION PROVINCIAL
- LABORATORIO HABILITADO
- LABORATORIO OFICIAL
- PUESTO DE CONTROL EN AEROPUERTO
- PUESTO DE CONTROL EN PUERTO
- PUESTO DE CONTROL FRONTERIZO

SÍMBOLOS CONVENCIONALES

- Calentamiento
- Capital
- HIDROGRAFÍA
- Campo de agua
- Desagüe
- Cauces
- LÍMITES
- Límite provincial

AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA DE
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRICULTO
PROGRAMA NACIONAL SANITARIO PORCINO

ESCALA GRÁFICA 1:1 000 000
0 50 100 Kilómetros

PROYECCIÓN TRANSVERSA DE MERICATOR
ZONA 17
DATUM VERTICAL: NIVEL MEDIO DEL MAR

**MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
ACUACULTURA Y PESCA**
AGROCALIDAD
SISTEMA DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA
Y AGROPECUARIA

MAPA DE UBICACIÓN DE GRANJAS PORCINAS

REALIZACIÓN: SIGAGRO

ESCALA ORIGINAL: 1:250 000

FUENTE: AGROCALIDAD, 2010
CARTOGRAFÍA BASE: IGM

FECHA: ENERO, 2011

Figura 11. Proporción y ubicación de granjas de ganado porcino en el Ecuador. Datos que se obtuvieron en el Censo nacional. (AGROCALIDAD 2012)

Provincia	# granjas porcícolas	# verracos	# cerdas reemplazo	# cerdos crecimiento	# madres/ vientres/	# lechones	# cerdos engorde
AZUAY	23	28	92	913	194	281	1083
BOLIVAR	38	53	109	498	429	808	1371
CAÑAR	52	70	87	909	630	939	1424
CARCHI	33	44	268	2050	974	1586	3118
CHIMBORAZO	80	122	417	4023	1962	3558	384
COTOPAXI	22	71	345	4944	1330	1941	4953
EL ORO	189	290	904	5741	3208	5305	7096
ESMERALDAS	147	189	686	2569	1216	2438	9916
FRANCISCO DE ORELLANA	94	72	98	479	447	1029	307
GUAYAS	109	241	964	6864	3440	4658	16300
IMBABURA	66	74	155	554	489	937	599
LOJA	108	109	233	834	672	1506	1179
LOS RIOS	47	78	254	1504	876	1503	820
MANABI	181	208	805	1844	1885	3257	1558
MORONA SANTIAGO	79	81	332	449	505	1160	467
NAPO	52	45	164	224	315	749	468
PASTAZA	24	27	56	346	317	686	259
PICHINCHA	117	111	414	4310	2737	4532	9566
SANTA ELENA	9	26	479	3762	1231	1454	6005
SANTO DOMINGO DE LOS SACHILAS	121	217	3210	35057	10700	19635	52501
SUCUMBIOS	46	49	191	742	379	524	936
TUNGURAHUA	52	71	193	599	432	723	425
ZAMORA CHINCHIPE	62	78	301	385	686	1293	967

Figura 12. Población porcícola de acuerdo a cada provincia con número de granjas porcinas y tipo de ganado. (AGROCALIDAD 2012)

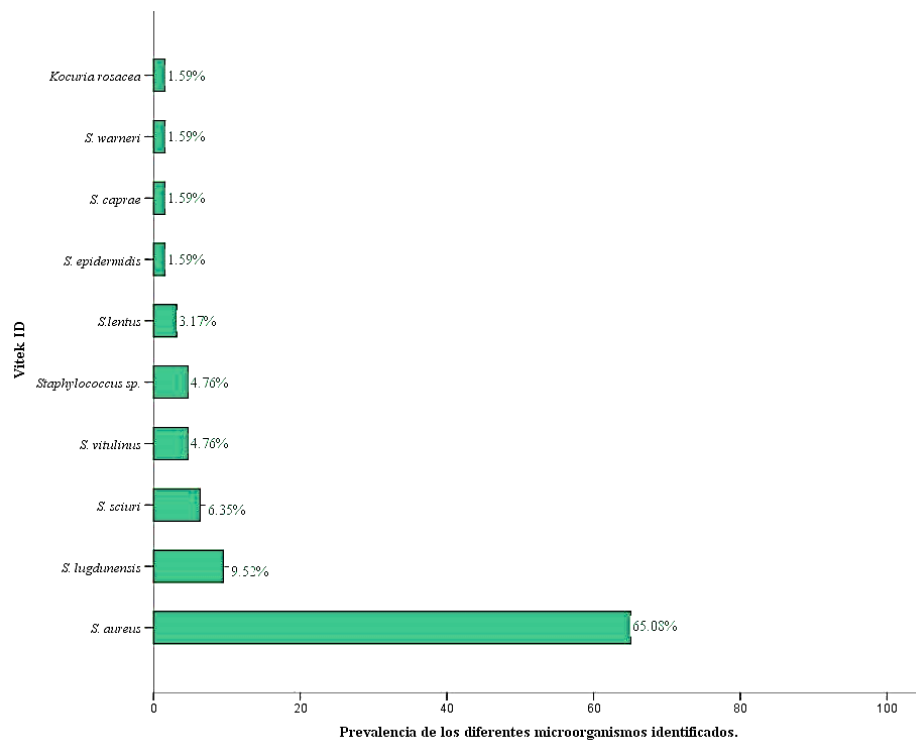


Figura 13. Distribución de crecimiento bacteriano. Frecuencias de los diferentes tipos de *Staphylococcus* encontrados, identificados por Vitek2®. En las muestras provenientes de los 115 hisopados nasales.

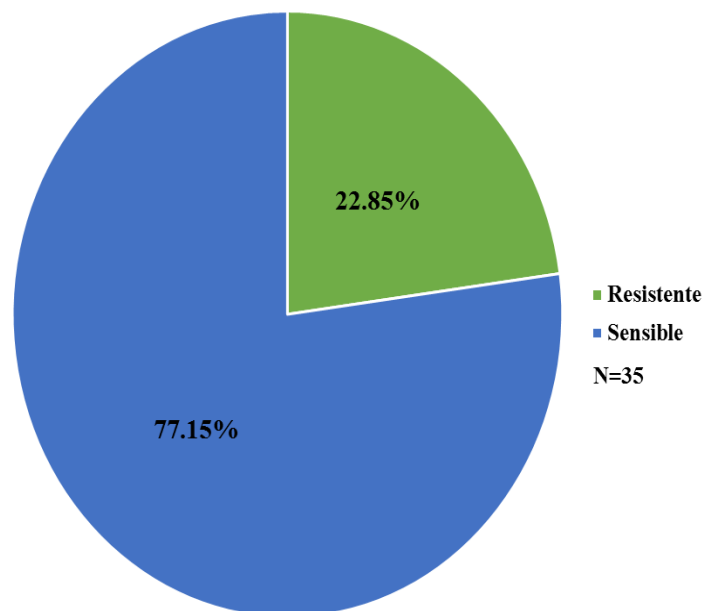


Figura 14. Frecuencias de crecimiento en CHROMOagar MRSA® como prueba fenotípica, evidenciando la sensibilidad y resistencia a la meticilina, en las cepas de *S.aureus* aisladas, provenientes de los hisopados nasales de cuidadores de ganado porcino, en la provincia de Pichincha, 2014.

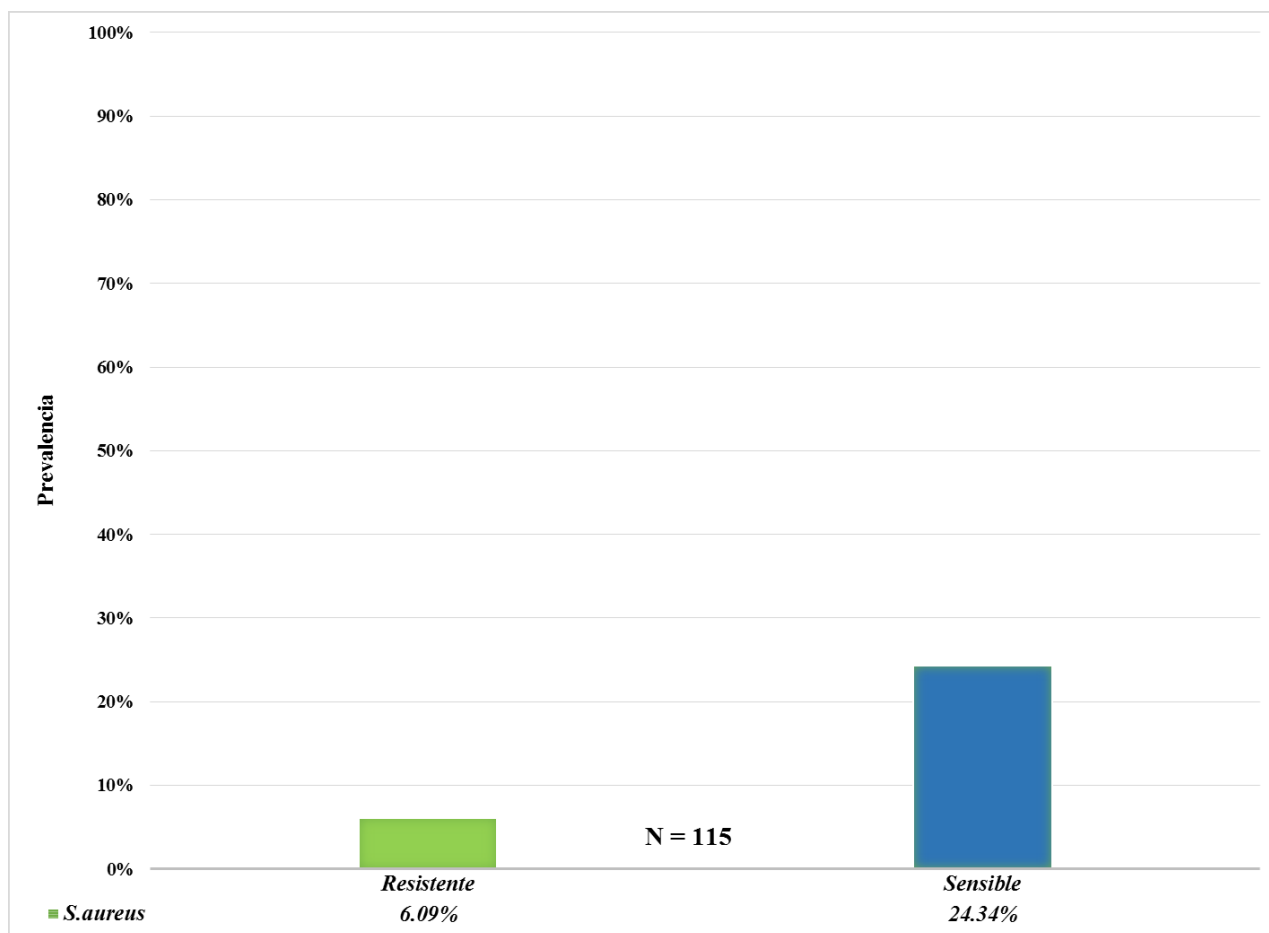


Figura 15. Prevalencia de *S. aureus* resistente a metilicina, identificados por Vitek2®. En cuidadores en contacto continuo de ganado porcino, sin factores de riesgo nosocomial, en la provincia de pichincha, 2014. (N=115)

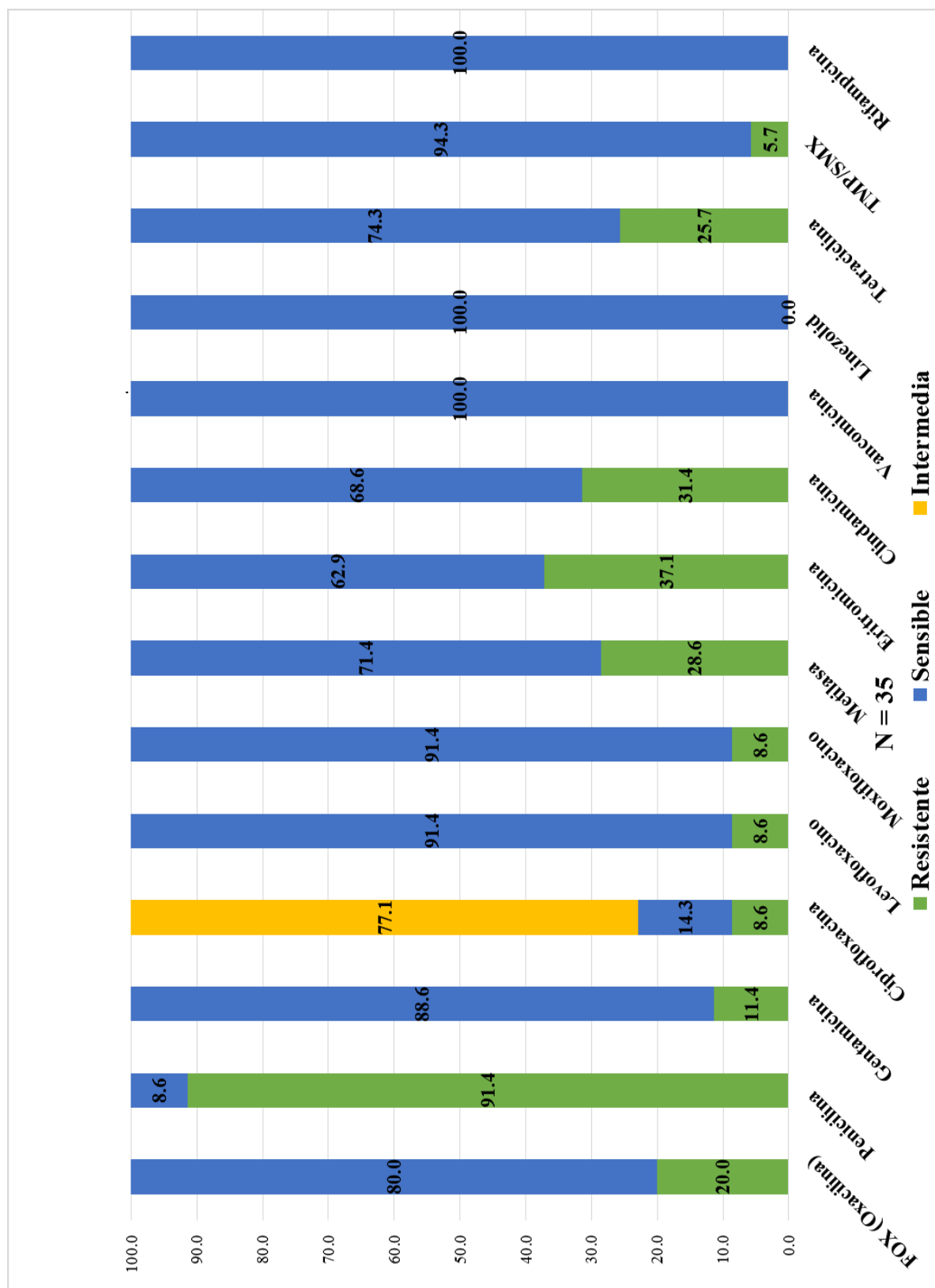


Figura 16. Perfiles de resistencia obtenidos del sistema Vitek2® en las cepas de *S. aureus* aisladas. Muestras provenientes de hisopados nasales en cuidadores en contacto continuo de ganado porcino, provincia de Pichincha, 2014

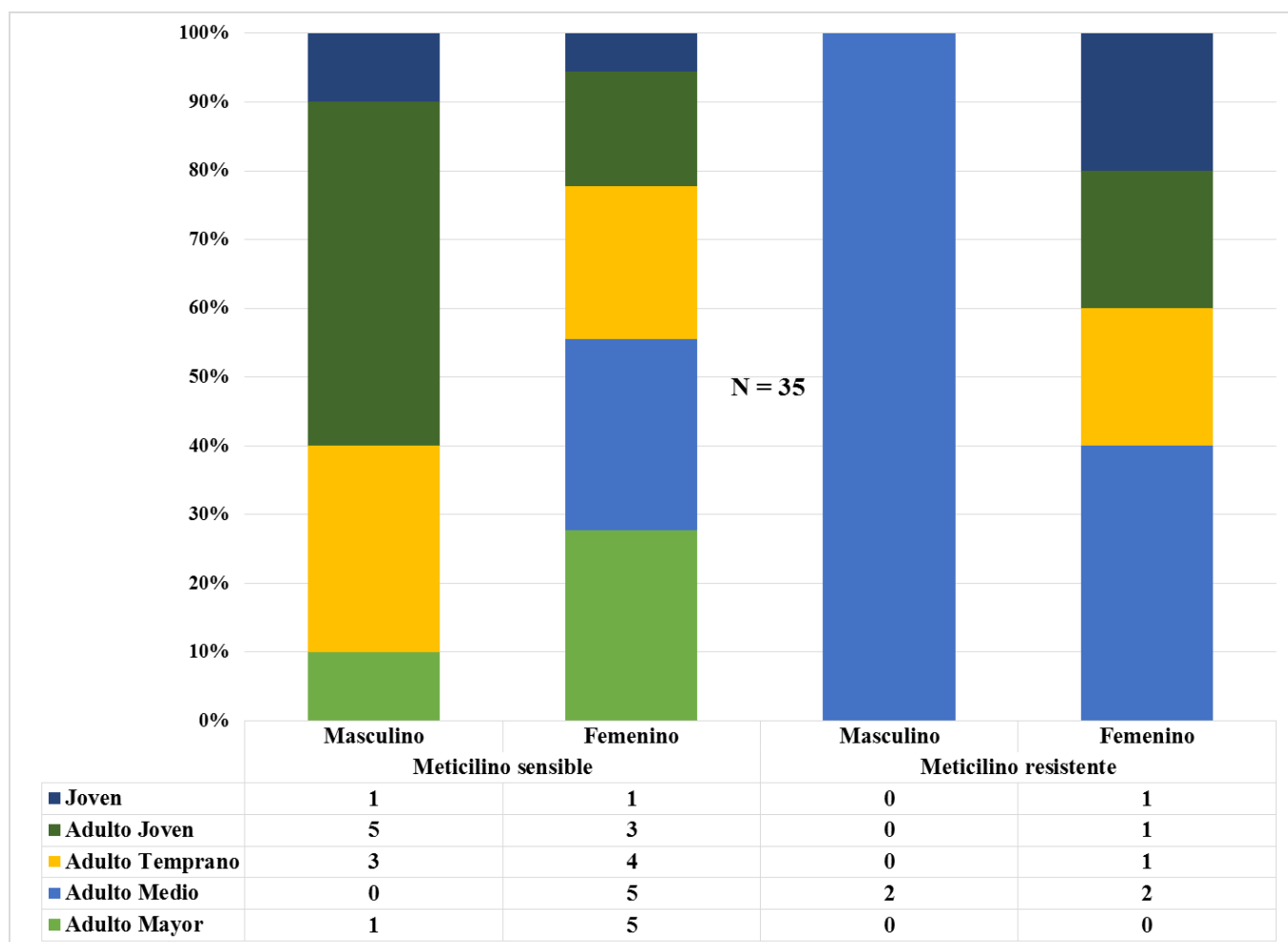


Figura 17. Distribución de *S. aureus* meticilino sensibles y resistentes, divididos por grupo etario y sexo. Muestras provenientes de hisopados nasales en cuidadores en contacto continuo de ganado porcino, provincia de Pichincha, 2014.

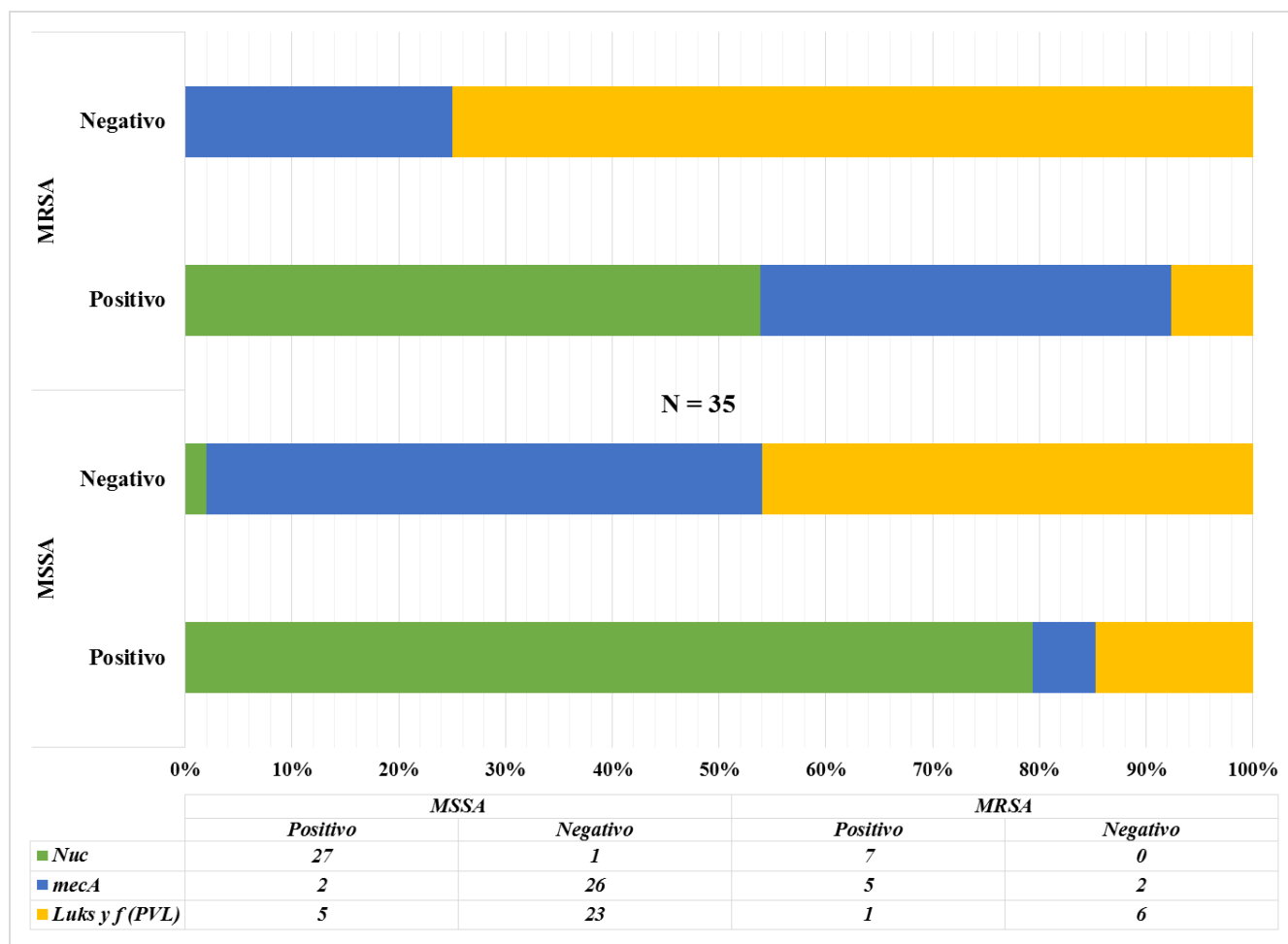


Figura 18. Distribución genética de la presencia de *nuc*, *mecA* y *luk s/f* codifican PVL, en los *S. aureus* aislados de acuerdo a su patrón de meticilino sensibilidad y resistencia. Muestras provenientes de hisopados nasales en cuidadores en contacto continuo de ganado porcino, provincia de Pichincha, 2014.

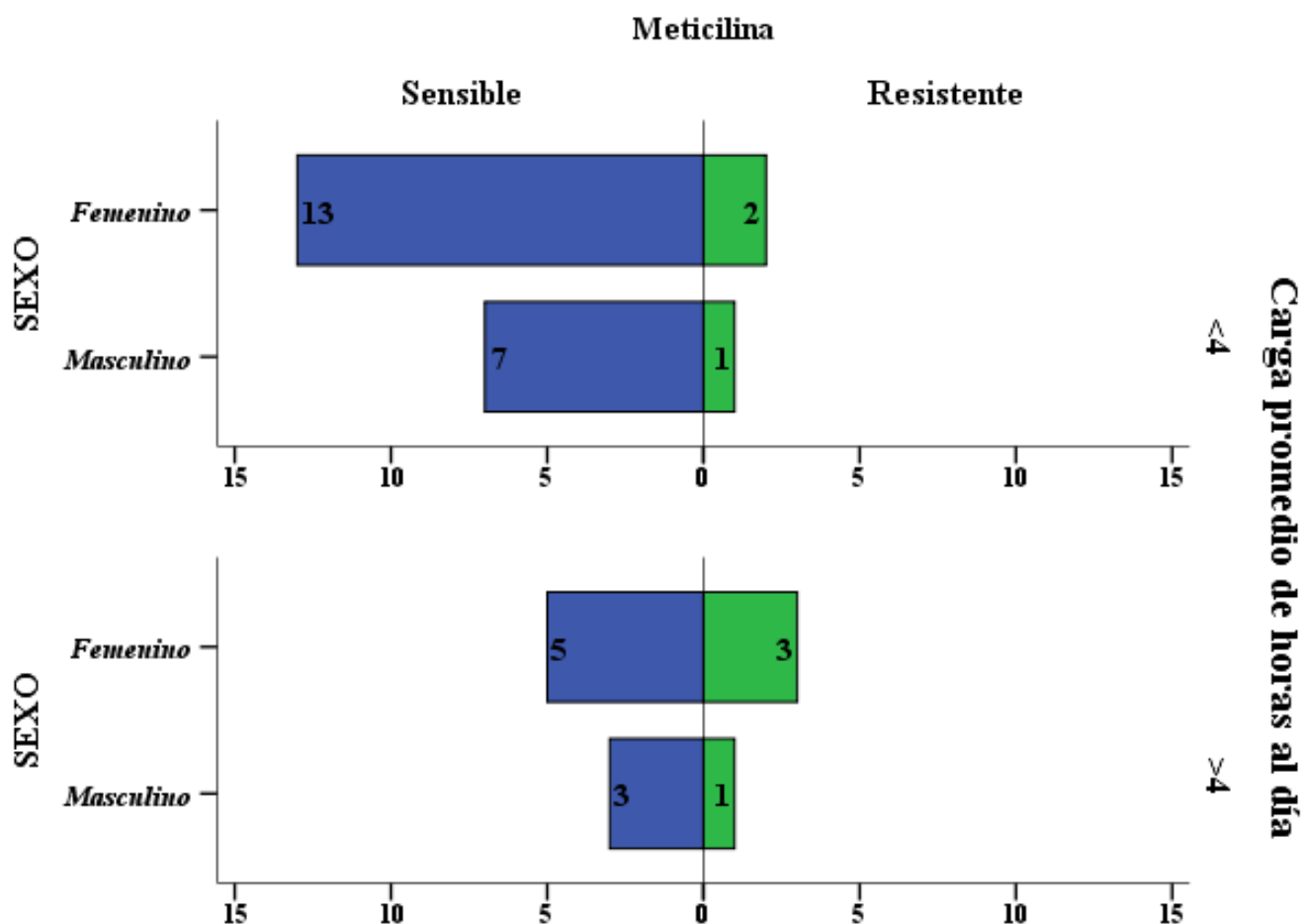


Figura 19. Distribución de aislamientos de *S. aureus*, en relación a la carga horaria promedio diaria, dedicada por los cuidadores al contacto continuo de ganado porcino, agrupados por sexo y perfil de resistencia a la meticilina. Provincia de Pichincha, 2014.

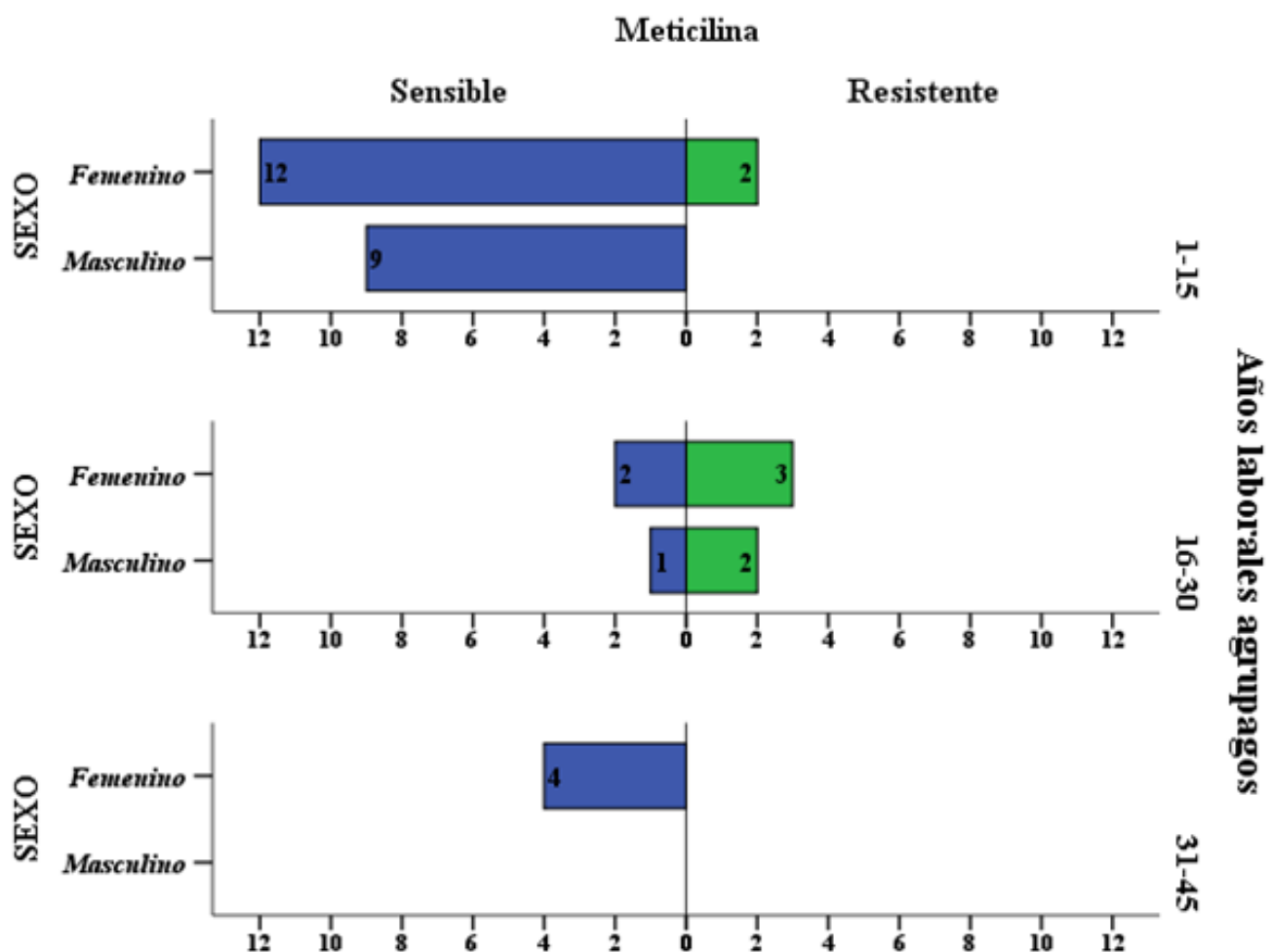


Figura 20. Distribución de aislamientos de *S. aureus*, en relación a los años laborales dedicados, al cuidado continuo en los porcicultores, agrupados por sexo y perfil de resistencia a la metilicina. Provincia de Pichincha, 2014.

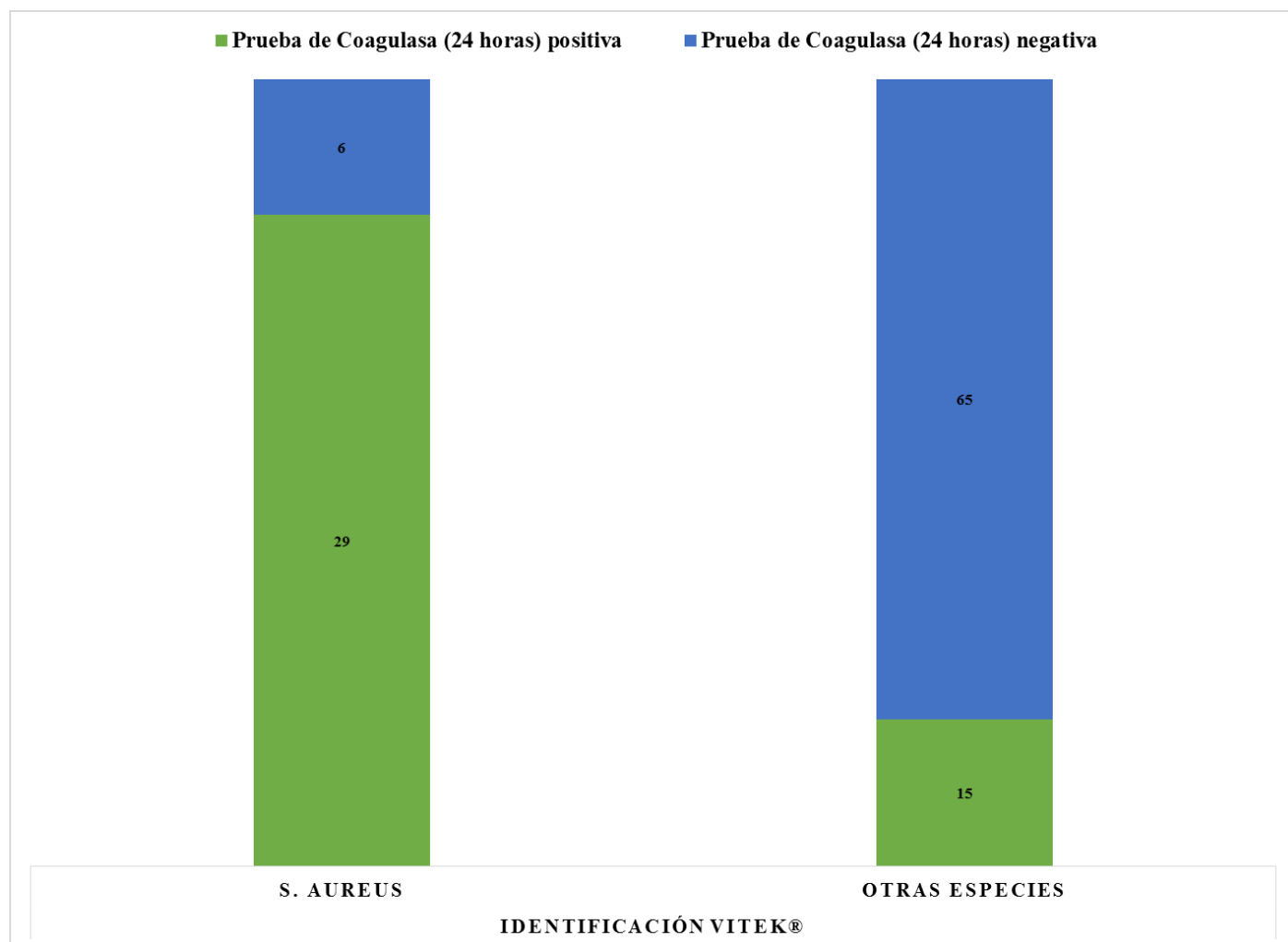


Figura 21. Comparación de resultados fenotípicos obtenidos de la prueba de coagulasa en 24 horas *versus* identificación por Vitek2®, para la especie *S. aureus*, en la muestra obtenida en cuidadores al contacto continuo de ganado porcino sin criterios nosocomiales. Provincia de Pichincha, 2014.

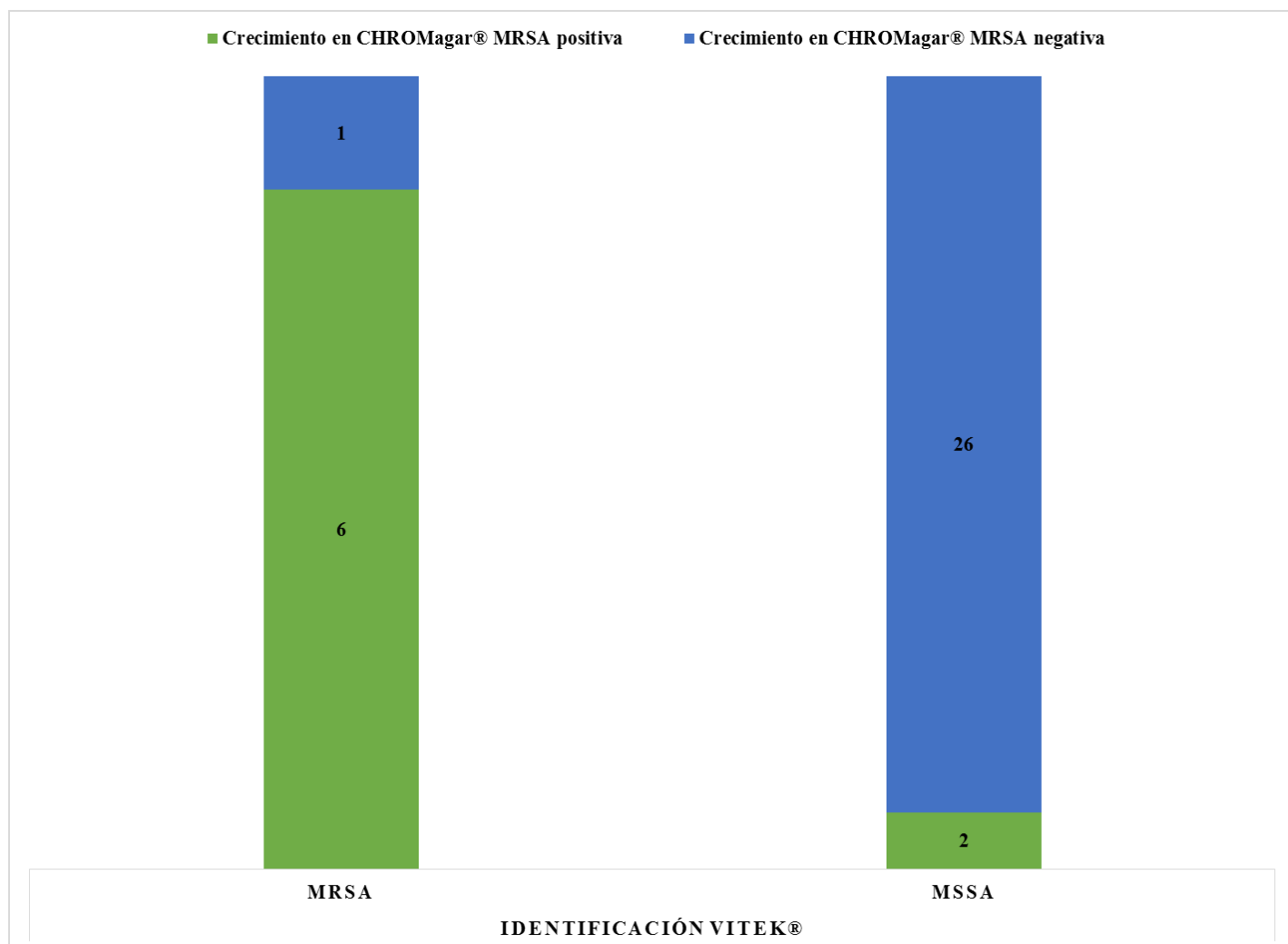


Figura 22. Comparación de resultados fenotípicos obtenidos del crecimiento en agar sólido colorimétrico (CHROMagar MRSA®) vs. Identificación por el perfil de resistencia en Vitek2®, en los *S. aureus* aislados, en la muestra obtenida en cuidadores al contacto continuo. Provincia de Pichincha, 2014.

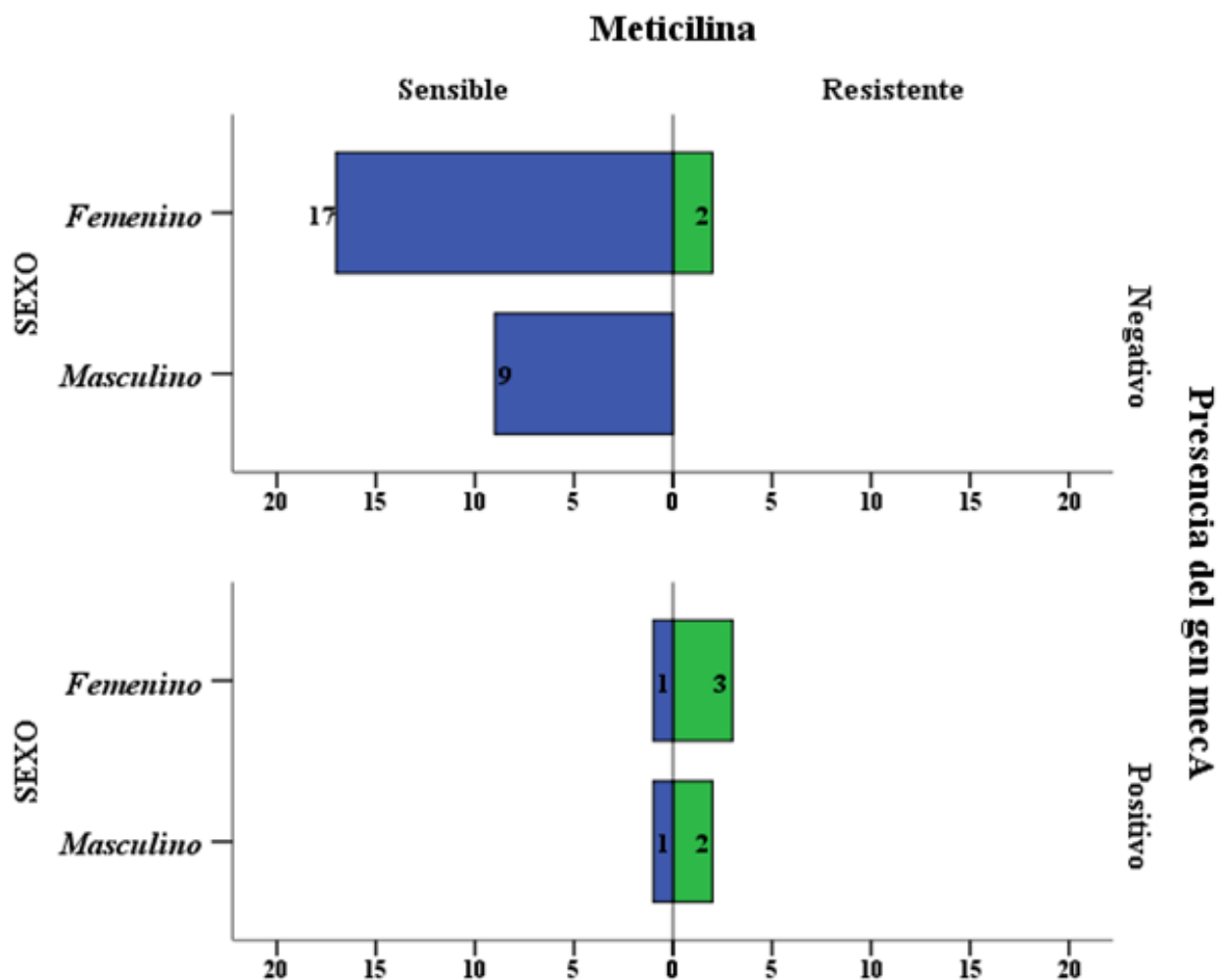


Figura 23. Comparación de resultados Presencia del gen *mecA* por PCR multiplex versus identificación por Vitek2®, en MRSA aislados, de la muestra obtenida en cuidadores al contacto continuo de ganado porcino, sin criterios nosocomiales. Provincia de Pichincha, 2014.

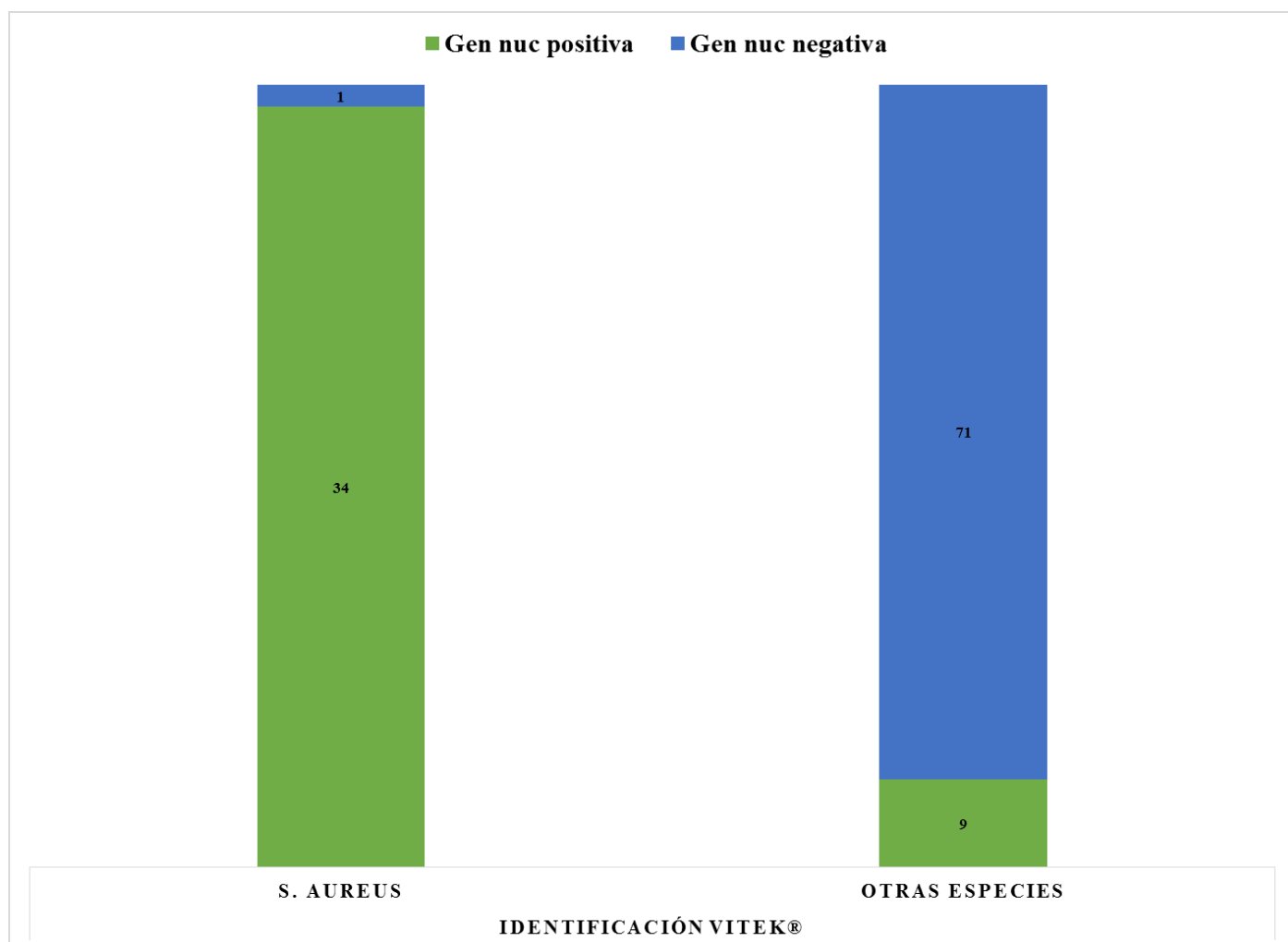


Figura 24. Comparación de resultados genéticos, del PCR Multiplex que detecta gen *nuc* en *S. aureus* versus identificación bacteriana por Vitek2®, en la muestra obtenida en cuidadores al contacto continuo de ganado porcino, sin criterios nosocomiales. Provincia de Pichincha, 2014.

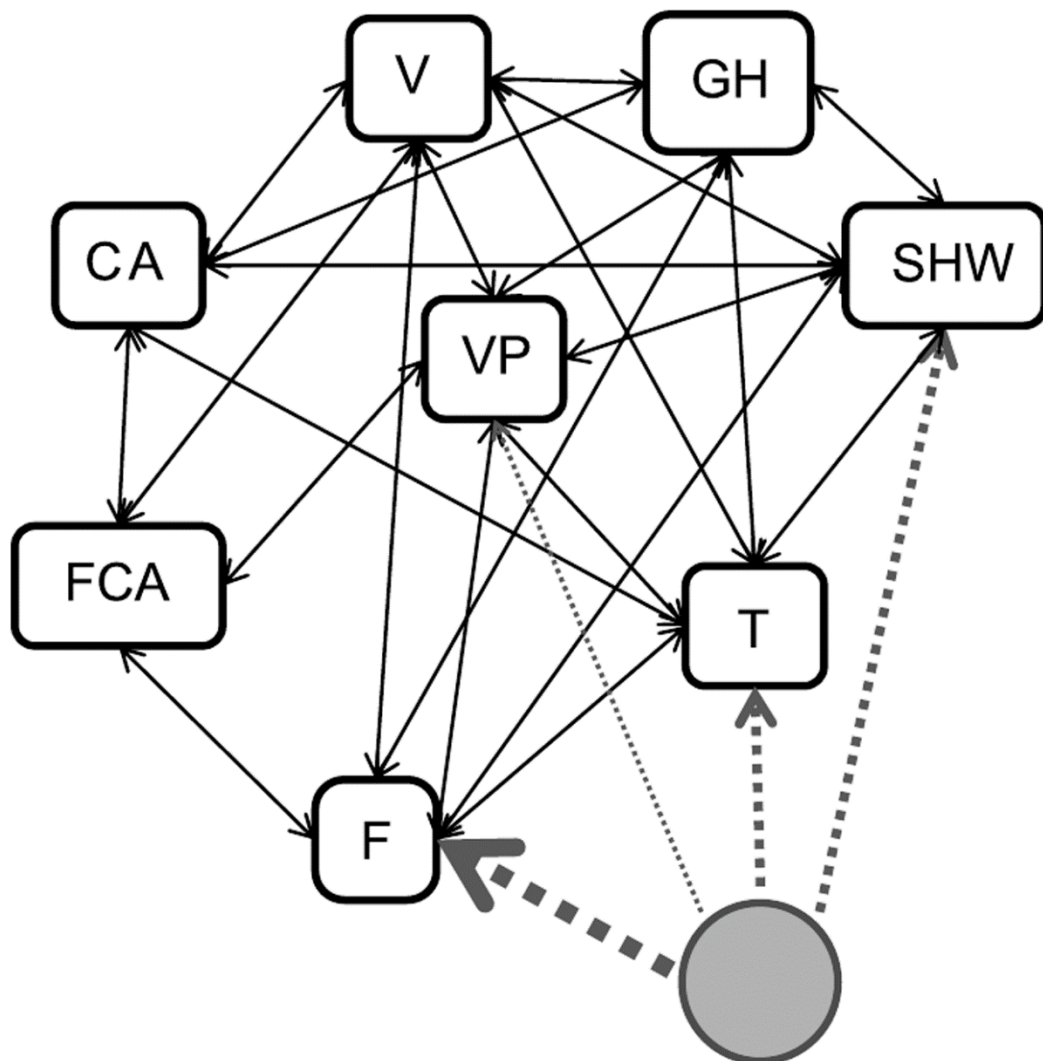


Figura 25. Representación del modelo de transmisión de MRSA en las granjas de cerdos en la comunidad. La exposición a los cerdos (*círculo gris*). Entre estas poblaciones, dos involucran mascotas (perros y/o gatos) (**CA: animales de compañía, FCA: los animales de compañía en la granja de cerdos**). Las seis poblaciones restantes involucran los seres humanos con exposición CA-MRSA (**F: Los cuidadores de la granja de cerdos, VP: Veterinarios porcícolas, T: Transportadores, SHW: Trabajadores del matadero V: veterinarios mascotas, GH: la población humana en general – familiares de toda esta red laboral**). *Flechas continuas* representan los contactos entre individuos de diferentes poblaciones. *Flechas discontinuas* representan la exposición directa a los cerdos. (Tomado y modificado por Sebastián Rivadeneira del artículo de: Porphyre T, Giotis ES, Lloyd DH, Stärk KDC. A metapopulation model to assess the capacity of spread of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans.)

TABLAS

Tabla 2. Taxonomía de las especies del *Staphylococcus*. Las Diversas Especies del Género *Staphylococcus*. (Tabla traducida y modificada del capítulo referente a Especies de *Staphylococcus*, de Gillaspay AF, Iandolo J. *Staphylococcus*. Encyclopedia of Food Microbiology. 2009. p. 293–303.)

Especies de <i>Staphylococcus</i> reconocidos en la actualidad.	
<i>S. arlettae</i>	<i>S. aureus</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. capitis</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. carnosus</i>
<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. condimenti</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. felis</i>
<i>S. fleurettii</i>	<i>S. gallinarum</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>S. kloosii</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lutrae</i>
<i>S. muscae</i>	<i>S. nepalensis</i>
<i>S. pasteurii</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
<i>S. piscifermentans</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
<i>S. pulvereri</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. schleiferi</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>S. simiae</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. succinus</i>
<i>S. vitulinus</i>	<i>S. warneri</i>
<i>S. xylosus</i>	

Tabla 3. Ubicación por las parroquias productoras de Ganado porcino en la Provincia de Pichincha, junto con la distribución del crecimiento bacteriano. Recuento por cepas encontradas de los diferentes *Staphylococcus*.

		UBICACIÓN GEOGRÁFICA									
		Aloag	Yaruquí	Checa	Cotogcho	Guamaní	Machachi	Pintag	Sangolquí	Tambillo	Tumbaco
		FRECUENCIAS									
Frecuencia bacteriana colonizan a nivel nasal	<i>S. aureus</i>		2	1	2	3		9	12	4	8
	<i>S. lugdunensis</i>			1	1		1		3		
	<i>S. sciuri</i>				2	1			1		
	<i>S. vitulinus</i>								1	1	1
	<i>S. warneri</i>								1		
	<i>S.lentus</i>				1				1		
	<i>S. caprae</i>							1			
	<i>S. epidermidis</i>				1						
	<i>Staphylococcus</i> sp.				1				1		1

Tabla 4. Frecuencias de las cepas identificados por VITEK®, divididas por su sensibilidad y resistencia a la meticilina en los distintos sitios de producción de ganado porcino. Provincia de Pichincha, 2014.

		Oxacilina			
		Sensible		Resistente	
		N	%	N	%
UBICACIÓN GEOGRÁFICA	Aloag	0	0.00%	0	0.00%
	Yaruquí	0	0.00%	1	2.86%
	Checa	1	2.86%	0	0.00%
	Cotogchoa	2	5.71%	0	0.00%
	Guamaní	0	0.00%	3	8.57%
	Machachi	0	0.00%	0	0.00%
	Pintag	8	22.86%	1	2.86%
	Sangolquí	7	20.00%	1	2.86%
	Tambillo	4	11.43%	0	0.00%
	Tumbaco	6	17.14%	1	2.86%

Tabla 4. Contaje diferenciado, por carga horaria (exposición) entre los aislamientos de *S. aureus* meticilino sensible y resistente.

	<i>S. aureus</i> meticilino resistente	<i>S. aureus</i> meticilino sensible	
JORNADA COMPLETA	4 (a)	8 (b)	12 (a+b)
MEDIA JORNADA	3 (c)	20 (d)	23 (c+d)
	7	28	35

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

Tabla 5. Contaje diferenciado, por años laborales dedicado a la porcicultura (Exposición) entre los aislamientos de *S. aureus* meticilino sensible y resistente.

	<i>S. aureus</i> meticilino resistente	<i>S. aureus</i> meticilino sensible	
LARGA TRAYECTORIA	5 (a)	7 (b)	12 (a+b)
CORTA TRAYECTORIA	2 (c)	21 (d)	23 (c+d)
	7	28	35

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

Tabla 6. Contaje diferenciado, por resultados de coagulasa vs. Vitek2®, en *S. aureus* aislados, como prueba fenotípica inicial aplicada a la totalidad de la muestra.

	<i>S. aureus</i>	Otras Especies	
<i>Coagulasa positiva</i>	29 (a)	15 (b)	44 (a+b)
<i>Coagulasa negativa</i>	6 (c)	65 (d)	71 (c+d)
	35	80	115

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

Tabla 7. Contaje diferenciado, por resultados de coagulasa vs. Vitek2®, en *S. aureus* aislados, como prueba fenotípica inicial aplicada a la totalidad de la muestra.

	<i>S. aureus</i> <i>meticilino</i> <i>resistente</i>	<i>S. aureus</i> <i>meticilino</i> <i>sensible</i>	
<i>Crecimiento en CHROMagar MRSA®</i> <i>(Colonias rosa malva). Presente</i>	6 (a)	2 (b)	8 (a+b)
<i>Sin Crecimiento en CHROMagar</i> <i>MRSA® (Colonias rosa malva). Ausente</i>	1 (c)	26 (d)	27 (c+d)
	7	28	35

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

Tabla 8. Contaje diferenciado, por presencia de gen *mecA* identificado por PCR Multiplex vs. Perfiles de resistencia emitidos por Vitek2®, comparando la prueba genotípica para determinar la meticilino resistencia.

	<i>S. aureus</i> <i>meticilino</i> <i>resistente</i>	<i>S. aureus</i> <i>meticilino</i> <i>sensible</i>	
<i>Presencia de gen mecA</i>	5 (a)	2 (b)	7 (a+b)
<i>Ausencia del gen mecA</i>	2 (c)	26 (d)	28 (c+d)
	7	28	35

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

Tabla 9. Contaje diferenciado, por presencia de gen *nuc* identificado por PCR Multiplex vs. Identificación bacteriana determinada por Vitek2®, como prueba genotípica para determinar la especie.

	<i>S. aureus</i> <i>meticilino</i> <i>resistente</i>	<i>S. aureus</i> <i>meticilino</i> <i>sensible</i>	
<i>Presencia de gen nuc</i>	34 (a)	9 (b)	43 (a+b)
<i>Ausencia del gen nuc</i>	1 (c)	24 (d)	25 (c+d)
	35	33	68

*Realizado por Sebastián Rivadeneira Rojas.

ANEXOS

GLOSARIO

Agar Cromogénico	Medio de cultivo que marca un color y textura ante el crecimiento de colonias específicas.
Agar CHROMagar MRSA®	Medio de cultivo que ante el crecimiento de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente, otorga un color rosa malva. Período de incubación es de 48 hora promedio.
Agar manitol-salado	(Siglas en Inglés: MSA) , Medio de cultivo que permite el crecimiento de microorganismos afines al cloruro de sodio (NaCl 7.5%-10%), Haciéndolo selectivo para <i>Staphylococcus</i> . Se tornan colonias amarillas-doradas si son coagulasa positivos y rojos si son coagulasa negativos.
Fenotipo	Rasgo morfológico o característica física observable de un organismo
Fibrina	(Proviene de filamento - fibra) Es un polímero de fibrinógeno, que constituye una malla protéica insoluble, que forma un tapón hemostático.
Fibrinógeno	Es una glicoproteína que constituye el factor I de la coagulación, esencial para la formación del coágulo. Se encuentra en los gránulos de alfa de las plaquetas. Precursor de la fibrina.
Genotipo	Conjunto de genes/material genético que posee un organismo, que determina los caracteres morfológicos (fenotipo).
Hemolisina	Citotoxina que lisa eritrocitos.
Hemólisis	Destrucción de eritrocitos
Leucocidina	Citotoxina que lisa leucocitos.
metcilina	Antibiótico betalactámico, inhibe la síntesis de la pared celular y de enlaces entrecruzados de peptidoglicano de las bacterias gram positivas. Espectro idéntico a la oxacilina.
Nose Picking	Hurgarse la nariz
Oxacilina	Antibiótico betalactámico, inhibe la síntesis de la pared celular y de enlaces entrecruzados de peptidoglicano de las bacterias gram positivas. Espectro idéntico a la metcilina.
Zoonosis	Es la transmisión de una enfermedad que proviene de un animal a un ser humano

FOTOGRAFÍAS

Hisopado nasal



Medios de transporte Stuart



Ganado porcino



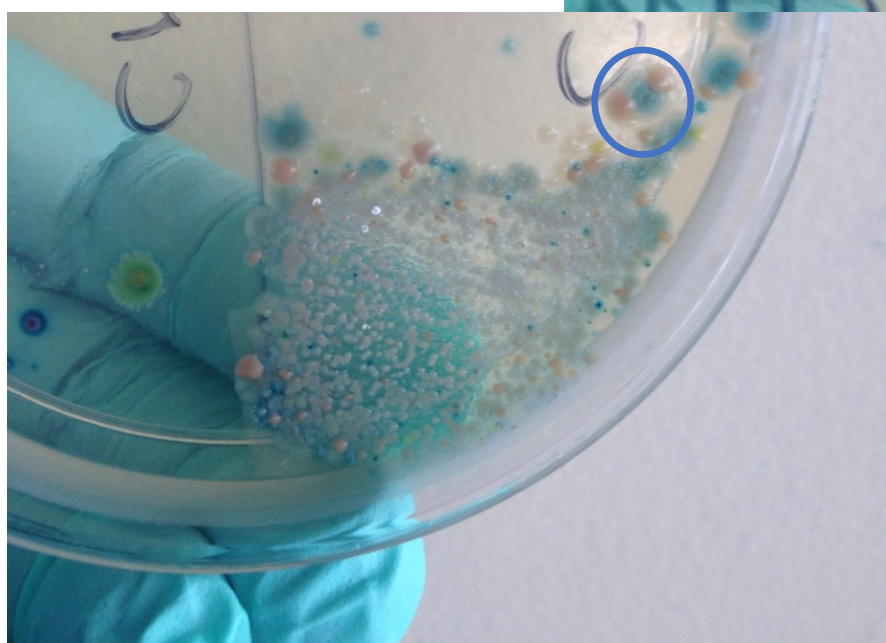
Identificación fenotípica



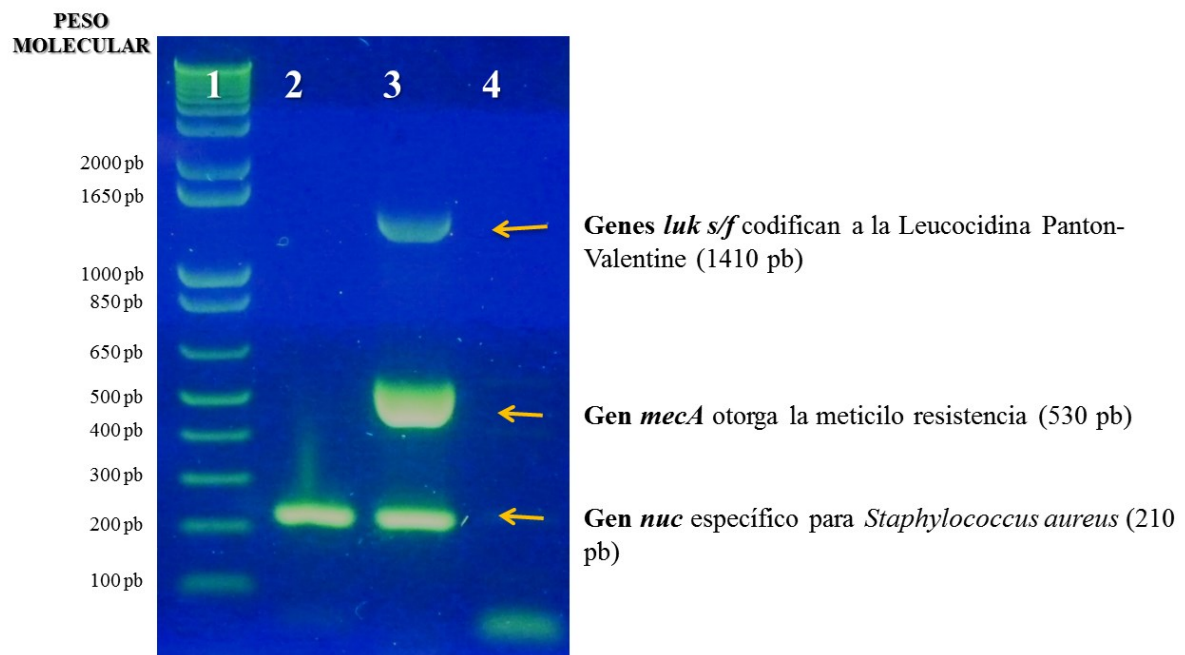
Agar manitol salado (MSA)



CHROMagar MRSA® - Colonias rosa malva.



PCR Multiplex – Analisis Genotípico



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Facultad de Medicina
Consentimiento Informado



Título de Investigación: **Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, aislados en trabajadores de granjas porcinas, de la provincia de Pichincha, 2014.**

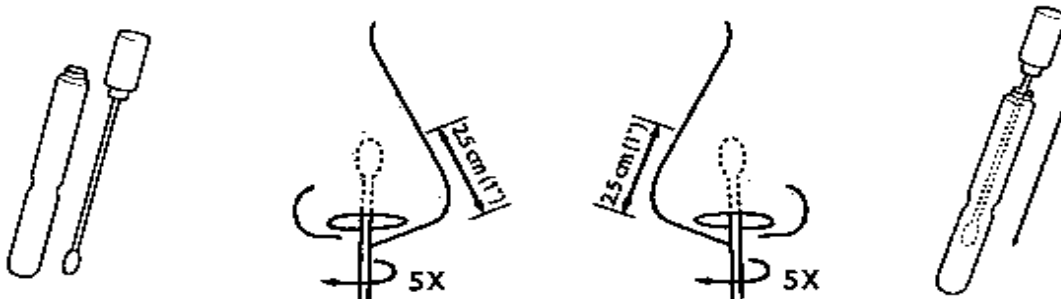
Se le pide a usted, participar en un estudio de investigación. Este formulario de consentimiento, donde describe los procedimientos del estudio, los riesgos y los beneficios de la participación, en la realización del **HISOPADO NASAL JUNTO CON OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN SOBRE SU ACTIVIDAD CON EL CUIDADO CON LOS CERDOS**, el mismo que no tiene ningún costo alguno. Este proceso de informarle y de requerirle su permiso, se conoce como **CONSENTIMIENTO INFORMADO**. Si usted decide participar en este estudio, se le pedirá que firme este formulario al final de haber comprendido y tras haber aclarado todas sus dudas.

¿POR QUÉ SE HACE ESTE ESTUDIO?

El propósito de este estudio es investigar qué tipo de bacterias tiene en sus **FOSAS NAALES**. Se sabe que bacterias normales viven en nuestra nariz pero hay otro tipo de bacterias que las personas que están en contacto con ganado porcino, son más susceptibles de contagio y son aquellas que poseen cierta resistencia a antibióticos (medicinas). Uno de los objetivos con este hisopado, es encontrar el mecanismo de cómo desarrollan estas bacterias y causan resistencia a ciertos antibióticos.

¿CÓMO ES EL PROCEDIMIENTO?

El Material principal es un **HISOPO NASAL**, que es un recolector de moco nasal, tipo palillos de plástico, flexibles, que tienen el aspecto similar a un **cotonete**, se moverá dentro de su nariz, en cada uno de sus orificios nasales, verticalmente, sin causar ningún daño, ni sangrado, ni dolor. El procedimiento dura aproximadamente 20 segundos en cada fosa nasal. Posterior a la toma, será guardada en un medio de transporte especial, y será analizada en un laboratorio para identificar la bacteria.



PASOS:

- Se procede al abrir el estuche que contiene el hisopo (Cotonete).
- Introducir en una narina, aproximadamente 2 a 3 cm y rótelos frotando suavemente las paredes de cada orificio nasal, repetir procedimiento en ambas fosas nasales.
- Posterior, se finaliza introduciendo el hisopo en el tubo conteniendo el medio de transporte. El mismo que es rotulado con su nombre y será analizado, para buscar las bacterias que le hemos explicado.

¿QUÉ ESTÁ INVOLUCRADO EN EL ESTUDIO?

La información personal que se recoge de usted como la edad, el sexo, y detalles laborales como las horas diarias y los años que ha dedicado al cuidado porcino. Nos ayudarán a orientarnos en la frecuencia que dedica usted a esta labor. **TAL INFORMACIÓN SERÁ CONFIDENCIAL Y ANÓNIMA**. Esta información será guardada en una base de datos privada, Nadie tendrá acceso a ella, únicamente el autor de esta investigación.



¿CUÁLES SON LOS RIESGOS DEL ESTUDIO?

No hay riesgos de salud para la participación en este estudio.

¿CUÁLES SON LOS COSTOS?

No tiene ningún costo este examen en este estudio de investigación. Como también no se le pagará por participar.

¿QUÉ PASA CON LA PRIVACIDAD?

Los registros del estudio que le identifican serán personales. Toda la información obtenida y muestras de laboratorio (**hisopado nasal**) generados serán estrictamente privadas y se almacena en un ordenador protegido por contraseña y sólo puede acceder el autor de la investigación.

¿CUÁLES SON MIS DERECHOS COMO PARTICIPANTE?

La participación en este estudio es voluntaria. Si usted decide no participar en este estudio, no hay ninguna replica laboral, ni médica ni represión social alguna. En el caso de ser afirmativo, se le dará una copia firmada de este documento. Este documento forma de un consentimiento que no tiene una fecha de caducidad.

¿CUÁL ES EL BENEFICIO?

Usted posterior a su participación voluntaria, y tras la obtención de la muestra de su nariz, siendo estos pasos requisito para procesar e identificar al *Staphylococcus aureus*. Serán comunicados vía telefónica sus resultados, en los casos positivos, se procederá a realizar un seguimiento en su entorno familiar y laboral.

Para mayor información, puede comunicarse al Autor de la investigación, el mismo que responderá cualquier duda.

Sebastián Rivadeneira Rojas

Estudiante de la Facultad de Medicina- Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

0999745142 - Movistar



CONSENTIMIENTO

PARTICIPANTE

El proyecto de investigación y la obtención de información han sido explicados, de la manera que usted decida voluntariamente su participación. Los procedimientos experimentales en este caso el **Hisopado Nasal**, es seguro, sin potencial de generar ningún daño.

He entendido, que no tiene ningún costo alguno realizarse como también no recibiré remuneración a cambio. Voy a recibir una copia de la información de este formulario de consentimiento donde se detalla los propósitos del estudio, los mismos que me han explicado con claridad y he tenido oportunidad de realizar preguntas, las mismas que están claras.

Adicionalmente, estoy de acuerdo en participar voluntariamente en este estudio. Que tiene como Título de Investigación:

Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, aislados en trabajadores de granjas porcinas, de la provincia de Pichincha, 2014.

Mi participación es libre, desinteresada y no tengo que firmar este formulario si no quiero ser parte de este estudio de investigación. **Pero si deseo participar**, he informado datos de filiación, y detalles breves sobre mi actividad laboral (Años que le he dedicado a esta actividad, horas promedio al día) relacionada al cuidado de ganado porcino. Para que se me pueda contactar e informar los resultados he dado mis números de contacto. Al firmar estoy consciente de lo antedicho.

Para mayores de edad:

Firma del Participante o huella dactilar: _____

Fecha: _____ Hora: _____ AM / PM

Para menores de edad:

Representante legal: _____

Nombre: _____ Parentesco: _____

Firma de Representante o huella dactilar: _____

Fecha: _____ Hora: _____ AM / PM

**Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Facultad de Medicina**



RECOLECCIÓN DE DATOS

Edad: _____ años

Sexo: M F

• Ocupación: _____

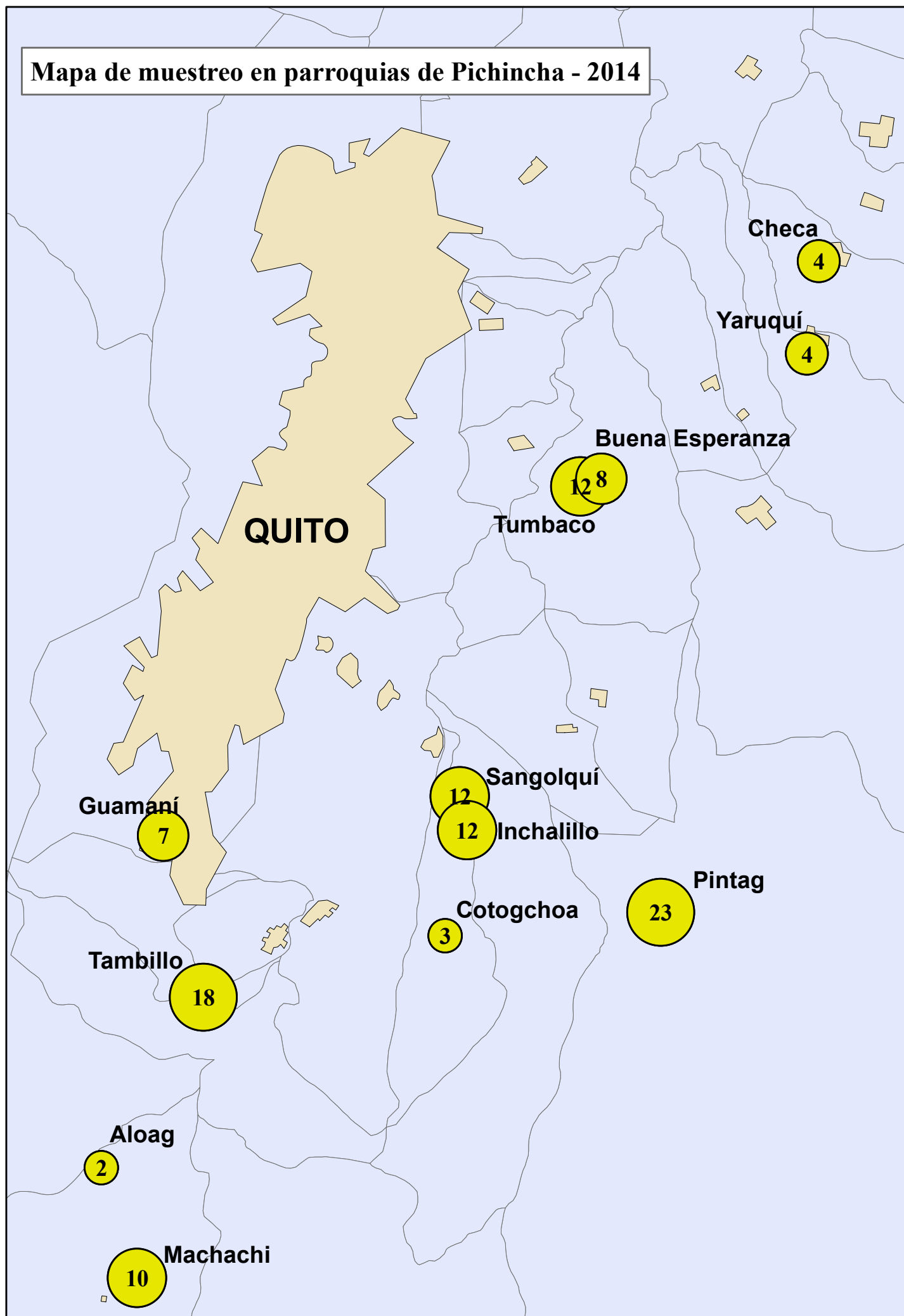
- Años dedicados a la actividad porcícola: _____ años
- Horas diarias promedio dedicadas a la actividad porcícola: _____ horas/día.
- ¿Usted alguna vez ha sido hospitalizado más de 3 días? SI NO
- ¿Ha tomado antibióticos en los últimos 2 meses? SI NO

NÚMERO DE HISOPADO: _____

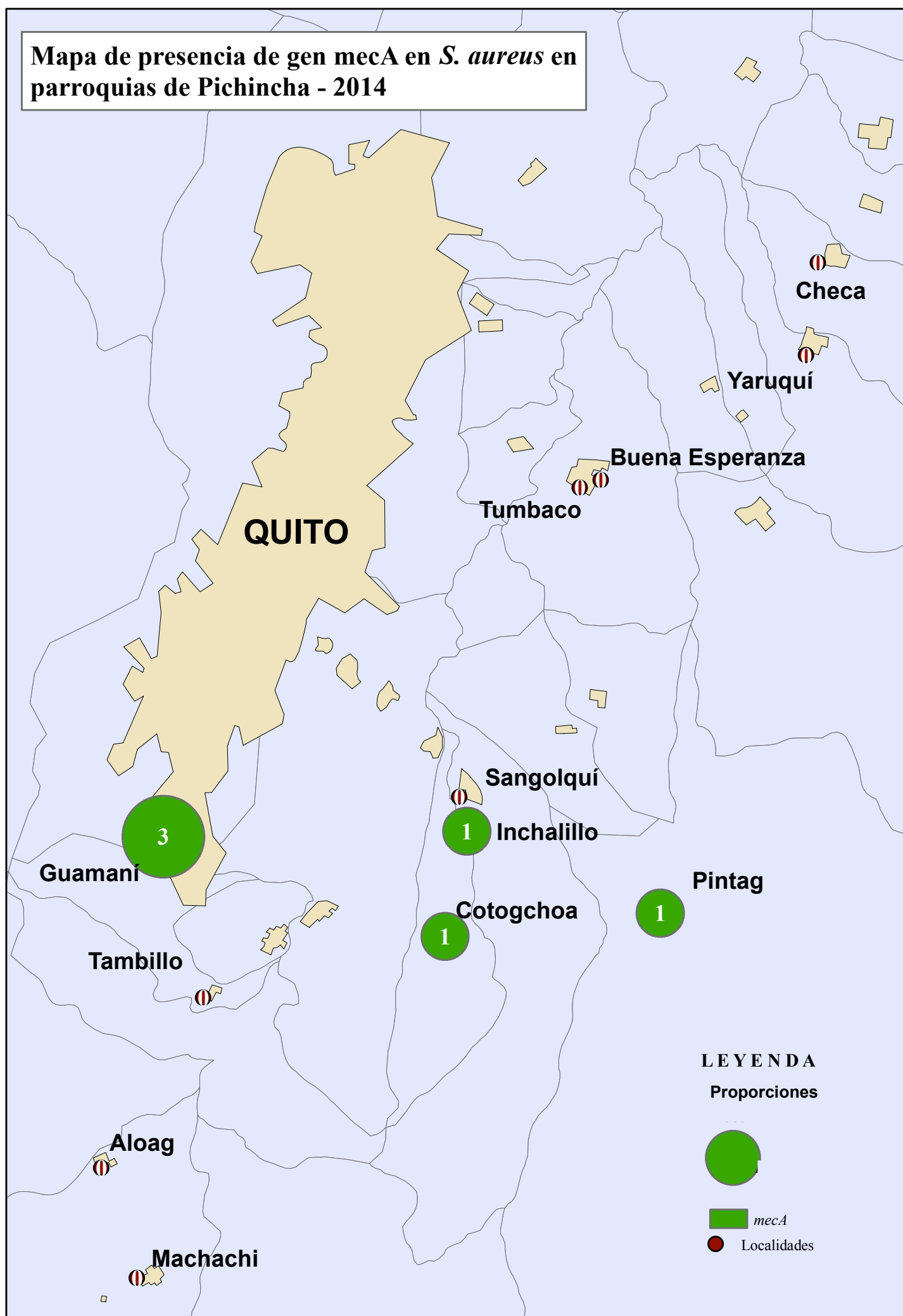
LABORATORIO

Variable	Indicador Definición operacional	Escala
Aislamiento o por cultivo de <i>S. aureus</i>	Crecimiento de bacteria en estudio. Agar Manitol Salado	1. Si 2. No
	Crecimiento de bacteria en estudio. CHROMagar MRSA®	1. Si 2. No
	Vitek2® Identificación de especie de <i>Staphylococcus aureus</i>	3. Si 4. No
Meticilino Resistencia	Perfil de resistencia por Vitek2® Meticilino resistencia	1. Si 2. No
	Comprobación genética 1. <i>Nuc</i>	1. Positivo 2. Negativo
	2. <i>mecA</i>	1. Positivo 2. Negativo
	3. <i>PVL</i>	1. Positivo 2. Negativo

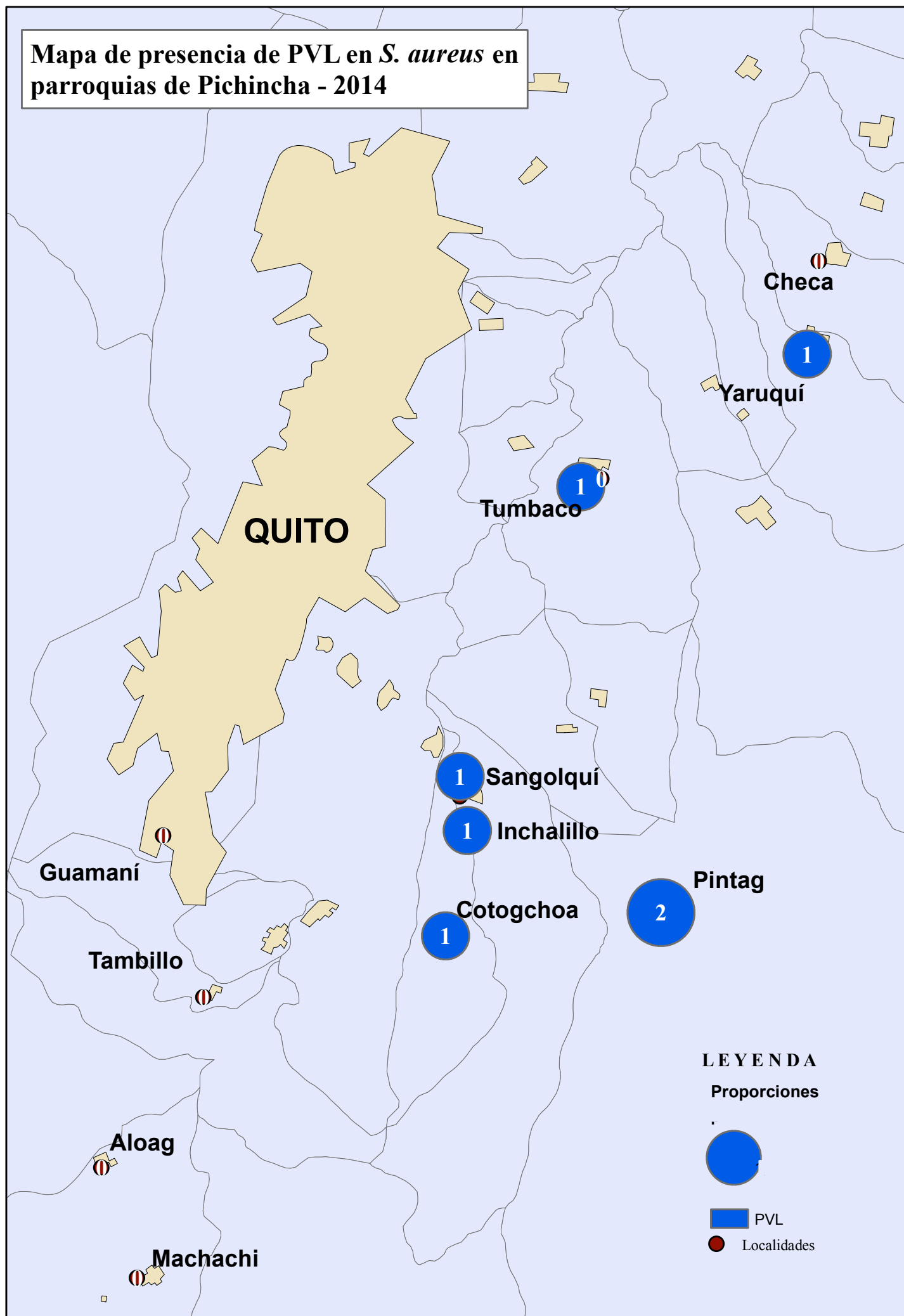
Mapa de muestreo en parroquias de Pichincha - 2014



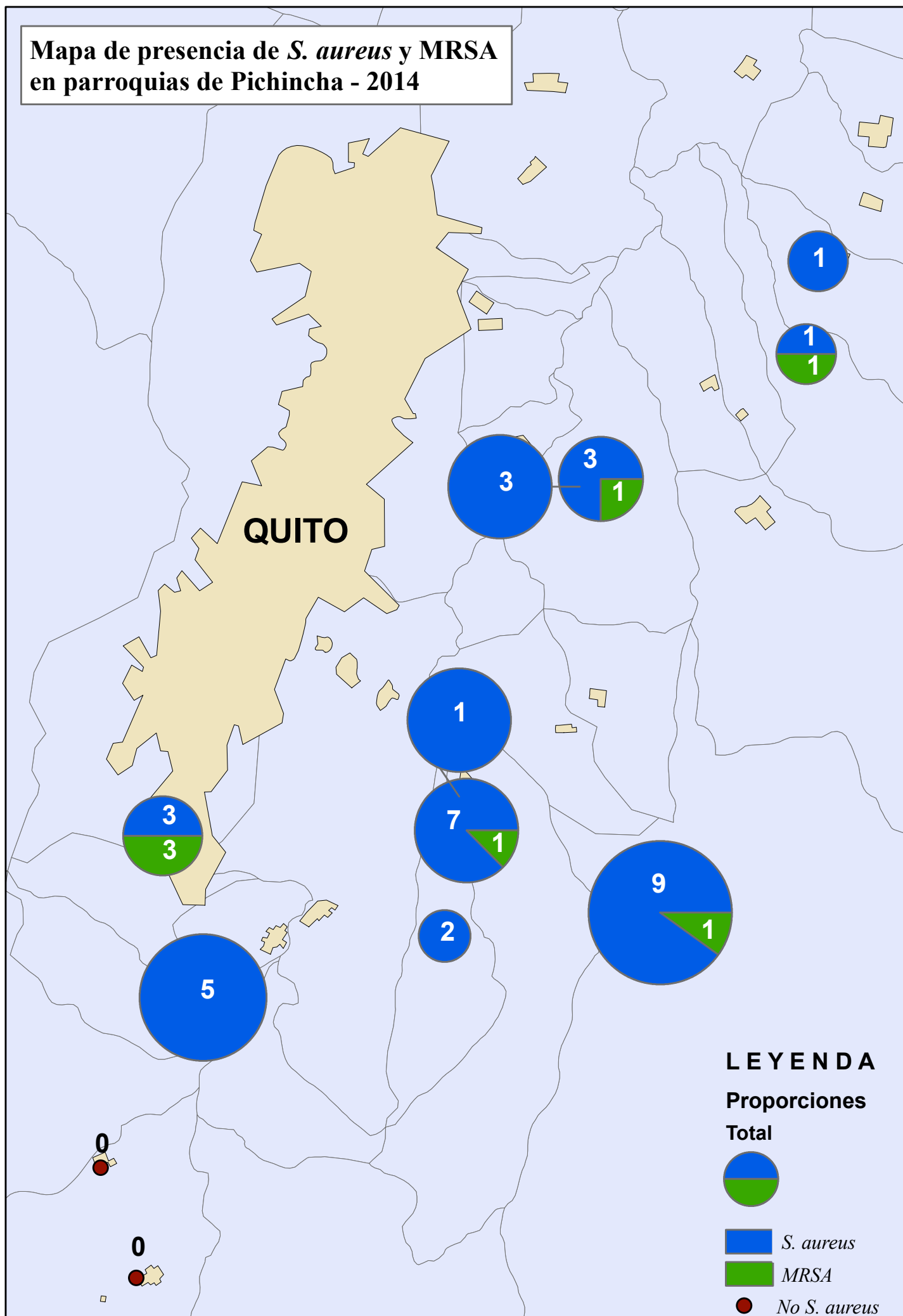
Mapa de presencia de gen *mecA* en *S. aureus* en parroquias de Pichincha - 2014



Mapa de presencia de PVL en *S. aureus* en parroquias de Pichincha - 2014



Mapa de presencia de *S. aureus* y MRSA en parroquias de Pichincha - 2014



BIBLIOGRAFIA

1. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Leeuwen W Van, Belkum A Van, Verbrugh HA, et al. Subscription Information : Review The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. 2005;5(December):751–62.
2. Seija V. Género *Staphylococcus*. Etiopatogenia microbiológica. 2008. p. 255–72.
3. Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Jan [cited 2014 Sep 9];21:583–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541411>
4. Chua KYL, Howden BP, Jiang J-H, Stinear T, Peleg AY. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Jan [cited 2014 Sep 11];21:554–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23628638>
5. Gillaspay AF, Iandolo J. *Staphylococcus*. Encyclopedia of Food Microbiology. 2009. p. 293–303.
6. Jaime A. Bustos-Martínez¹, Aída Hamdan-Partida² MG-C. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed. 2006;17(4):287–305.
7. Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J. Isolation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy carriers in a Mexican community. Int J Infect Dis [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Jun 18];18:22–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135699>
8. González C, Maribel J, Armindo J, General DB, Bioanálisis E De. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus* Mechanisms of Resistance To β -Lactam Antibiotics in *Staphylococcus aureus*. 2010;38(1):18–35.
9. Frank KL, Del Pozo JL, Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Oct 26];21(1):111–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2223846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

10. Natalia J, Quiceno J, María M, Ochoa C. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina : bases moleculares de la resistencia , epidemiología y tipificación. 2009;22(2):147–58.
11. Zecconi A, Scali F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunol Lett [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 Feb [cited 2014 Jun 1];150(1-2):12–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376548>
12. Brakstad ODDG, Aasbakk K, Maeland JA. polymerase chain reaction amplification of the Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene. 1992;30(7).
13. Van Leeuwen W, Roorda L, Hendriks W, Francois P, Schrenzel J. A nuc-deficient methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. FEMS Immunol Med Microbiol [Internet]. 2008 Nov [cited 2014 Oct 2];54(2):157. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18811719>
14. Aspiroz C, Lozano C, Gilaberte Y. Caracterización molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina ST398 en pacientes con infecciones cutáneas y sus familiares. ... y Microbiol Clínica [Internet]. 2012 [cited 2014 Jun 18];30(1):18–21. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X11002606>
15. Anderson D, Sexton D, Baron E. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in adults. 2012 [cited 2014 Jun 18];2–9. Available from: <http://46.4.230.144/web/UpToDate.v19.2/contents/f28/17/29216.htm>
16. Cervantes-garcía E, García-gonzález R, Salazar-schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. 2014;61(1):28–40.
17. Zarazaga M, Boudabous A, Torres C. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy humans with different level of contact with animals in Tunisia: genetic lineages, methicillin-resistance and virulence factors. "European J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;30(4):499–508.
18. Dressler a E, Scheibel RP, Wardyn S, Harper a L, Hanson BM, Kroeger JS, et al. Prevalence, antibiotic resistance and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* in pigs at agricultural fairs in the USA. Vet Rec [Internet]. 2012 May 12 [cited 2014 Oct 28];170(19):495. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505242>
19. Zaidi T, Zaidi T, Yoong P, Pier GB. *Staphylococcus aureus* corneal infections: effect of the Pantón-Valentine leukocidin (PVL) and antibody to PVL on virulence and pathology. Invest Ophthalmol Vis Sci [Internet]. 2013

- Jul [cited 2014 Oct 2];54(7):4430–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3700385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Castañón-sánchez CA. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. 2012;5:79–84.
 21. Portillo BC, Moreno JE, Yomayusa N, Alvarez CA, Cardozo BEC, Pérez JAE, et al. Molecular epidemiology and characterization of virulence genes of community-acquired and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Colombia. Int J Infect Dis [Internet]. 2013 Sep [cited 2014 Sep 11];17(9):e744–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623704>
 22. Martin E, Lina G, Dumitrescu O. Encyclopedia of Food Microbiology [Internet]. Second Edi. Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier; 2014 [cited 2014 Sep 11]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00317-7>
 23. John W. MRSA [Internet]. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki. 2007 [cited 2014 Jun 18]. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>
 24. Roche FM. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. Microbiology [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2014 Sep 11];149(10):2759–67. Available from: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.26412-0>
 25. WILLIAMS H. Plenary Session Abstracts: Thursday Morning, 26 th July Theme: ALLERGY. 2012 [cited 2014 Jun 18];23:2–104. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2012.01059.x/abstract>
 26. Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. Int J Med Microbiol [Internet]. Elsevier GmbH.; 2011 Aug [cited 2014 Sep 23];301(6):500–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570348>
 27. Sollid JUE, Furberg a S, Hanssen a M, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Jan [cited 2014 Sep 11];21:531–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619097>

28. Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights. *Int J Med Microbiol* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2013 Aug [cited 2014 Sep 11];303(6-7):350–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499303>
29. Otto M. Staphylococcus colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol*. 2011;5(2):183–95.
30. Graveland H, Wagenaar JA, Bergs K, Heesterbeek H, Heederik D. Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact. *PLoS One*. 2011;6(2).
31. Kluytmans J, van Belkum a, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1997 Jul;10(3):505–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Radosavljevic V, Zutic J, Pavlovic L, Boskovic T, Radanovic O, Zutic M. Methods of detection and typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet Glas* [Internet]. 2014 [cited 2014 Oct 28];68(1-2):89–99. Available from: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0350-24571402089R>
33. Proaño DC, Pazmiño FP. Prevalencia de portadores nasales asintomáticos de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente y su relación con factores de riesgo y protectores en el personal de salud del Hospital General de las Fuerzas Armadas. 2010;57:196–204.
34. OPS. *Staphylococcus aureus* Informe de Ateneo. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente: informe Ateneo general sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, 2004 Jul, Montevideo, Uruguay Montevideo: OPS. Elsevier; 2004. p. 36.
35. Fernández CL. Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina del linaje CC398 de distintos orígenes : resistencia , virulencia y contenido plasmídico. *Dep Agric y Aliment Área Bioquímica y Biol Mol Epid*. 2014;
36. Ben Slama K, Gharsa H, Klibi N, Jouini a, Lozano C, Gómez-Sanz E, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy humans with different levels of contact with animals in Tunisia: genetic lineages, methicillin resistance, and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2011 Apr [cited 2014 Jul 5];30(4):499–508. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076928>

37. Bonesso MF, Oliveira A De. CA-MRSA : Epidemiology of a Pathogen of a Great Concern. Epidemiology Insights. Estadual Paulista, Department of Microbiology and Immunology Biosciency Institute, Botucatu-SP Brazil; 2012. p. 53–78.
38. Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. Infect Genet Evol [Internet]. 2013 Mar [cited 2014 Sep 11];14:401–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340226>
39. Enríquez AR, Ortega FV, Cohen IR. Neumonía necrotizante hemorrágica y SARM-AC como causa emergente. 2011;(3):143–8.
40. Original A. PCR múltiple para la detección simultánea de los genes mecA y pvl en *Staphylococcus* spp Multiplex PCR for simultaneous detection of mecA and pvl genes in *Staphylococcus* spp. 2012;10(1):5–13.
41. Casey J a, Shopsin B, Cosgrove SE, Nachman KE, Curriero FC, Rose HR, et al. High-density livestock production and molecularly characterized MRSA infections in Pennsylvania. Environ Health Perspect [Internet]. 2014 May;122(5):464–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4014753&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. Monaco M, Pedroni P, Sanchini A, Bonomini A, Indelicato A, Pantosti A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* responsible for human colonization and infection in an area of Italy with high density of pig farming. BMC Infect Dis [Internet]. 2013;13:258. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3679754&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
43. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2010 Jul [cited 2014 May 23];23(3):616–87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2901661&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Velázquez-meza ME, C M, Me V. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. 2005;47(5):381–7.
45. Jones LS, Howe RA. Biofilms in Infection Prevention and Control [Internet]. Biofilms in Infection Prevention and Control. Elsevier; 2014 [cited 2014 Sep 23]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397043-5.00015-3>

46. Davies J, Columbia B. Brenner's Encyclopedia of Genetics [Internet]. Brenner's Encyclopedia of Genetics, Second Edition. Elsevier; 2013 [cited 2014 Aug 15]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00068-1>
47. Graveland H, Wagenaar J a, Heesterbeek H, Mevius D, van Duijkeren E, Heederik D. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. PLoS One [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 May 27];5(6):e10990. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2882326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
48. Mukovnikova M, Yusuf E, Cossey V, Schuermans A, Saegeman V. Evaluation of a chromogenic biplate medium (ChromID MRSA/ChromID S. aureus) for the simultaneous detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in preoperative screening samples from the anterior nares. J Clin Microbiol [Internet]. 2014 Feb [cited 2014 Oct 15];52(2):678–80. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3911318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Report AH, Farm I, Production A, Mrsa LA, Resistant M. An HSUS Report : Industrial Farm Animal Production and Livestock Associated MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). 2012;3(127):1–12.
50. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis [Internet]. 2001 [cited 2014 Jun 18];1:147–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309901000913>
51. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. Lab Invest [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 Oct 2];87(1):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146447>
52. Nawaz SK, Riaz S, Riaz S, Hasnain S. Screening for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteriocin producing bacteria. 2009;8(3):365–8.
53. Lepelletier D, Lucet J-C. Controlling methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: not simply methicillin-resistant S. aureus revisited. J Hosp Infect [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 May [cited 2014 Oct 2];84(1):13–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523159>

54. Arabia S, Zealand N. A review of community-associated methicillin resistant staphylococcal aureus (CA-MRSA) cases in Hong Kong. *Sci Comm Emerg Zoonotic Dis*. 2005;
55. Mbbs MB, Hawkes M, Authors MC. Guidelines for the Prevention and Management of *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA): A Perspective for Canadian Health Care Practitioners Writing Group of the Expert Panel of Canadian Infectious Disease , Infection Prevention and Control , and Public Health. 2006;
56. Evans BRP. The silent epidemic: CA-MRSA and HA-MRSA. *AAOS*. 2005;8(11).
57. Ji Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols. Preface. [Internet]. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18715854>
58. Nimmo GR, Bergh H, Nakos J, Whiley D, Marquess J, Huygens F, et al. Replacement of healthcare-associated MRSA by community-associated MRSA in Queensland: confirmation by genotyping. *J Infect* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Nov [cited 2014 Jun 7];67(5):439–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872210>
59. Edwards B, Andini R, Esposito S, Grossi P, Lew D, Mazzei T, et al. Treatment options for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: Where are we now? *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. Taibah University; 2014 Sep [cited 2014 Sep 11];2(3):133–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716514000587>
60. Simor AE, Loeb M. The management of infection and colonization due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A CIDS/CAMM position paper. *Can J Infect Dis* [Internet]. 2004 Jan;15(1):39–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2094920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
61. Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, Dowson CG. JAC Original articles Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2000;763–70.
62. Neela V, Mohd Zafrul A, Mariana NS, van Belkum A, Liew YK, Rad EG. Prevalence of ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs and pig handlers in Malaysia. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2014 Jun 2];47(12):4138–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786656&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

63. McCarthy AJ, van Wamel W, Vandendriessche S, Larsen J, Denis O, Garcia-Graells C, et al. *Staphylococcus aureus* CC398 clade associated with human-to-human transmission. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2012 Dec [cited 2014 Jun 18];78(24):8845–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3502926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
64. Stefani S, Chung DR, Lindsay J a, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. Int J Antimicrob Agents [Internet]. Elsevier B.V.; 2012 Apr [cited 2014 May 27];39(4):273–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230333>
65. Smith TC, Pearson N. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. Vector Borne Zoonotic Dis [Internet]. 2011 Apr [cited 2014 Jun 18];11(4):327–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20925523>
66. Acosta-pérez G, Rodríguez-ábrego G, Longoria-revilla E, Sc M, Castro-mussot ME. Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* metilicilino-resistente de muestras clínicas en un hospital regional. 2012;54(1):1–6.
67. Aleixandre-górriz I, Domínguez- MV, Martínez-macías O. Carta al Director Prevalencia de *Staphylococcus aureus* portadores del gen mecA sensibles a cefoxitina : OS-SARM. 2014;27(3):215–6.
68. Paterson GK, Harrison EM, Craven EF, Petersen A, Larsen AR, Ellington MJ, et al. Incidence and characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from nasal colonisation in participants attending a cattle veterinary conference in the UK. PLoS One [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jun 16];8(7):e68463. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3711812&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Münch B, Wochenschr T. Open Access The impact of zoonotic MRSA colonization and infection in Germany. 2014;10:384–98.
70. Pantosti A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. Front Microbiol [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 May 27];3(April):127. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
71. Giannouli S, Labrou M, Kyritsis A, Ikonomidis A, Pournaras S, Stathopoulos C, et al. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-

- susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2010 Apr [cited 2014 Oct 2];65(4):626–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156801>
72. Labrou M, Michail G, Ntokou E, Pittaras TE, Pournaras S, Tsakris A. Activity of oxacillin *versus* that of vancomycin against oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates evaluated by population analyses, time-kill assays, and a murine thigh infection model. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2012 Jun [cited 2014 Oct 1];56(6):3388–91. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3370787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 73. Fall C, Seck A, Richard V, Ndour M, Sembene M, Laurent F, et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in pigs and farmers in the largest farm in Dakar, Senegal. Foodborne Pathog Dis [Internet]. 2012 Oct [cited 2014 Jun 18];9(10):962–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22953738>
 74. Brizzio AA. PCR-Multiplex *Staphylococcus aureus*. Universidad Nacional de San Martin. 2009.
 75. Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? Int J Med Microbiol [Internet]. Elsevier GmbH.; 2013 Aug [cited 2014 Sep 23];303(6-7):324–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3729626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 76. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Jan [cited 2014 Jun 18];13(1):43–54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3530297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 77. Taguchi H, Kaneko T, Onozaki M, Kubo R. Evaluation of a New Chromogenic Medium for Isolation of MRSA. 2004;57–8.
 78. Jorgensen JH, Crawford SA, Masterson M, Mansell MK, McElmeel ML, Fulcher LC. Direct Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing by the BD Phoenix , bioMérieux Vitek 2 , and Disk Diffusion Test Methods as Compared to Results Generated by the CLSI Broth Microdilution Test. 2006;2–5.
 79. Cherkaoui A, Renzi G, François P, Schrenzel J. Comparison of four chromogenic media for culture-based screening of meticillin-resistant

Staphylococcus aureus. J Med Microbiol [Internet]. 2007 Apr [cited 2014 Oct 26];56(Pt 4):500–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374891>

80. Al-ugaili D, Fadhil AA, Wohaieb SA. Comparison of Oxacillin Disc Diffusion Test with mecA Polymerase Chain Reaction and Cefoxitin Disc Diffusion Test for the Detection of Oxacillin- resistant *Staphylococcus aureus* Collected from Baghdad Hospitals. 2014;17(2):172–80.
81. Carey R, Mcallister S, Bruckner D, Johnston J, West KS. Automated methods for antibiotic susceptibility testing. 2006;12.
82. Tiwari HK, Sapkota D. Evaluation of different tests for detection of *Staphylococcus aureus* using coagulase (coa) gene PCR as the gold standard. 2008;10(2):129–31.
83. Zurita J. Resistencia bacteriana en el Ecuador. 2012.
84. Management D, Lane F, Gilbert JM, Medicine V, Place S, Staff C, et al. Guía para la Industria Evaluación de la inocuidad de nuevos medicamentos antimicrobianos para animales con respecto a sus efectos microbiológicos en bacterias de importancia en la salud humana.
85. Gatos PDE, Riesgo UN, La P, Humana S. Resistencia antimicrobiana de. 2007;101–14.
86. Breves N. Resistencia bacteriana. Una preocupación creciente. 1940;4–6.
87. Davies P. Pigs and MRSA: What are the human health risks and to whom? Coll Vet Med [Internet]. 2013 [cited 2014 Jun 18];(November). Available from: http://conservancy.umn.edu/bitstream/161537/1/FPRC_Issue_Brief_UDC_Pigs_MRSA_UDC_2013.pdf
88. Verkade E, Kluytmans J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Jan [cited 2014 Jun 3];21:523–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23473831>
89. Tenerife SC De, Canarias HU De. Detección y caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) aislados de cerdo negro canario. 2011;758:752–8.
90. Köck R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, et al. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis

[Internet]. 2009 Nov [cited 2014 May 27];28(11):1375–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772956&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

91. Williamson D a, Bakker S, Coombs GW, Tan HL, Monecke S, Heffernan H. Emergence and molecular characterization of clonal complex 398 (CC398) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in New Zealand. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2014 May [cited 2014 Jun 18];69(5):1428–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366685>
92. Paterson GK, Larsen J, Harrison EM, Larsen a R, Morgan FJ, Peacock SJ, et al. First detection of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in bulk tank milk in the United Kingdom, January to July 2012. Euro Surveill [Internet]. 2012 Jan;17(50):1–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3867000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
93. Ballhausen B, Jung P, Kriegeskorte A, Makgotlho PE, Ruffing U, von Müller L, et al. LA-MRSA CC398 differ from classical community acquired-MRSA and hospital acquired-MRSA lineages: Functional analysis of infection and colonization processes. Int J Med Microbiol [Internet]. Elsevier GmbH.; 2014 Jun 27 [cited 2014 Sep 11]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25034858>
94. Perez CM, Ferres M, Labarca J a. Pandemic (H1N1) 2009 reinfection, Chile. Emerg Infect Dis [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Jun 18];16(1):156–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2874388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
95. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Infection with Panton-Valentine leukocidin positive methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* 1034. Clin Infect Dis [Internet]. 2008 Nov [cited 2014 Jun 2];29(5):1128–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10524952>
96. Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. PLoS One [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Oct 28];4(1):e4258. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2626282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
97. Cuny C, Layer F, Köck R, Werner G, Witte W. Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) of clonal complex CC398, t571 from infections in humans are still rare in Germany. PLoS One [Internet]. 2013 Jan

- [cited 2014 Oct 22];8(12):e83165. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3867410&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
98. Van Cleef B a GL, Monnet DL, Voss A, Krziwanek K, Allerberger F, Struelens M, et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011 Mar [cited 2014 Jun 18];17(3):502–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3166010&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 99. Dorado-García A, Bos ME, Graveland H, Van Cleef BA, Verstappen KM, Kluytmans JA, et al. Risk factors for persistence of livestock-associated MRSA and environmental exposure in veal calf farmers and their family members: an observational longitudinal study. *BMJ Open* [Internet]. 2013 Jan 19 [cited 2014 Oct 28];3(9):e003272. Available from: <http://bmjopen.bmj.com/cgi/content/long/3/9/e003272>
 100. Porphyre T, Giotis ES, Lloyd DH, Stärk KDC. A metapopulation model to assess the capacity of spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Oct 28];7(10):e47504. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3480390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 101. Crombé F, Argudín MA, Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P. Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs. *Front Microbiol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jun 15];4(March):57. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3602589&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 102. Verheghe M, Pletinckx LJ, Crombé F, Van Weyenberg S, Haesebrouck F, Butaye P, et al. Cohort study for the presence of livestock-associated MRSA in piglets: effect of sow status at farrowing and determination of the piglet colonization age. *Vet Microbiol* [Internet]. 2013 Mar 23 [cited 2014 Sep 11];162(2-4):679–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23067724>
 103. Crombé F, Vanderhaeghen W, de Vogel CP, Van Wamel WJ, Barbé K, Hermans K, et al. Serological profiles in nursery piglets colonized with *Staphylococcus aureus*. *Vet Res* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jun 18];44:4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3558462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

104. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. Clin Infect Dis [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2014 May 26];52(3):285–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217178>
105. Cuny C, Nathaus R, Layer F, Strommenger B, Altmann D, Witte W. Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. PLoS One [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Jun 18];4(8):e6800. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2728842&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
106. Vossenkuhl B, Brandt J, Fetsch A, Käsbohrer A, Kraushaar B, Alt K, et al. Comparison of spa types, SCCmec types and antimicrobial resistance profiles of MRSA isolated from turkeys at farm, slaughter and from retail meat indicates transmission along the production chain. PLoS One [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Jul 4];9(5):e96308. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4006815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
107. Acosta A. Programa Nacional Sanitario Procino. Ecuador, Objetivos y metas año 2013. 2013 p. 62.
108. ASPE-AGROCALIDAD. Informe de Sanidad Animal Procina. 2013 p. 1–10.
109. ASPE-AGROCALIDAD. Convenio marco de cooperación técnica para ejecución del programa nacional sanitario porcino entre la agencia ecuatoriana de aseguramiento de calidad del agro – agrocalidad; y, la asociación de porcicultores – aspe. 2008 p. 1–6.
110. Health N, Survey E. National Health and Nutrition Examination Survey SPECIMEN COLLECTION PROCEDURES. 2000;(December).
111. Baptiste KE, Williams K, Willams NJ, Wattret A, Clegg PD, Dawson S, et al. resistant Staphylococci in Animals. 2005;11(12):2004–6.
112. Sandoval J. Tamaño de muestra en estudios clínicos. Acta Médica Costarric ISSN 0001-6012 [Internet]. 2009 [cited 2014 Nov 8];50(2004):20–1. Available from: http://www.actamedica.medicos.cr/index.php/Acta_Medica/article/view/347
113. Campelo FA, Pedrosa AC, Antúñez IÁ. Original Fenotipos y mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas en aislados de Streptococcus

agalactiae con significación clínica en un período de ocho años (2002-2010). 2012;25(1):42–6.

114. Johnson NP. Advantages to transforming the receiver operating characteristic (ROC) curve into likelihood ratio co-ordinates. Stat Med [Internet]. 2004 Jul 30 [cited 2014 Oct 9];23(14):2257–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15236429>
115. Ortín EO, Puche JASSJFM, García. IMH. Lectura crítica de un artículo sobre diagnóstico. Médicos de Familia y miembros del Grupo de MBE de la Sociedad Murciana de Medicina de Familia y Comunitaria. 2005 p. 66.
116. Spitalnic S. Test Properties 2: Likelihood Ratios, Bayes' Formula, and Receiver Operating Characteristic Curves. 2004;(October):53–8.
117. Platzer L, Aranís C, Beltrán C. Colonización nasal bacteriana en población sana de la ciudad de Santiago de Chile:¿ Existe portación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. ... y cirugía cabeza y ... [Internet]. 2010 [cited 2014 Nov 8];109–16. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-48162010000200003&script=sci_arttext&tlng=pt
118. Nadimpalli M, Rinsky JL, Wing S, Hall D, Stewart J, Larsen J, et al. Persistence of livestock-associated antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* among industrial hog operation workers in North Carolina over 14 days. Occup Environ Med [Internet]. 2014 Sep 8 [cited 2014 Oct 9];oemed–2014–102095–. Available from: <http://oem.bmj.com/cgi/content/long/oemed-2014-102095v1>
119. Oppliger A, Moreillon P, Charrière N, Giddey M, Morisset D, Sakwinska O. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains acquired by pig farmers from pigs. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2012 Nov [cited 2014 Oct 9];78(22):8010–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3485952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
120. Heilbronner S, Holden MTG, van Tonder A, Geoghegan J a, Foster TJ, Parkhill J, et al. Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2011 Sep [cited 2014 Oct 28];322(1):60–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3615170&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
121. Wijaya L, Hsu L-Y, Kurup A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: overview and local situation. Ann Acad Med

- Singapore [Internet]. 2006 Jul;35(7):479–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16902724>
122. Voss A, Loeffen F, Bakker J. *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. 2005;11(12):2004–5.
 123. Cui S, Li J, Hu C, Jin S, Li F, Guo Y, et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2009 Oct [cited 2014 Nov 8];64(4):680–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684078>
 124. Morcillo Rehberger AI. Estudio epidemiológico de la colonización de sarm en la cabaña porcina de Tenerife [Internet]. Universidad de la Laguna. 2010 [cited 2014 Nov 8]. p. 150. Available from: <ftp://veda.bbt.k.ucl.es/ccppytec/cp601.pdf>
 125. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol [Internet]. 2008 Apr 30 [cited 2014 Jun 18];128(3-4):298–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023542>
 126. Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. Euro Surveill [Internet]. 2010 Apr 22;15(16):1–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430001>
 127. Dahms C, Hübner N-O, Cuny C, Kramer A. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in farm workers and the livestock environment in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. Acta Vet Scand [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Oct 24];56:53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25142727>
 128. Diederens BMW, van Leest M-L, van Duijn I, Willemse P, van Keulen PHJ, Kluytmans J a JW. Performance of MRSA ID, a new chromogenic medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol [Internet]. 2006 Feb;44(2):586–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1392650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 129. Smith TC, Gebreyes W a, Abley MJ, Harper AL, Forshey BM, Male MJ, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. PLoS One [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Oct 9];8(5):e63704. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3646818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

130. Hagen RM, Seegmüller I, Navai J, Kappstein I, Lehn N, Miethke T. Development of a real-time PCR assay for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples. Int J Med Microbiol [Internet]. 2005 Jun [cited 2014 Nov 1];295(2):77–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15969468>
131. Fang H, Hedin G. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2003;41(7):2894–9.
132. Sissonen S, Pasanen T, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Tarkka E, Vaara M, et al. Evaluation of a commercial MRSA assay when multiple MRSA strains are causing epidemics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. Springer-Verlag; 2009;28(10):1271–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-009-0771-z>
133. Pizarro Velasco C. Detección y tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM) en Dakota del Norte , Estados Unidos Detection and molecular typing of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aure*. 2014. p. 111.
134. Graham MK. Panton-Valentine Leukocidin Expression in Community Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates From Rural Alaska. 2008.
135. Fall C, Seck A, Richard V, Ndour M, Sembene M, Laurent F, et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in pigs and farmers in the largest farm in Dakar, Senegal. Foodborne Pathog Dis [Internet]. 2012 Oct [cited 2014 Nov 8];9(10):962–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22953738>